



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS DE DEGRADAÇÃO DE PERÓXIDOS EM
FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS, GLIOMA DE RATOS (C6) E
NEUROBLASTOMA DE CAMUNDONGOS (N2a)

Péricles Arruda Mitozo

Orientador: Dr. Alcir Luiz Dafré

Florianópolis, 14 junho de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS DE DEGRADAÇÃO DE PERÓXIDOS EM
FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS, GLIOMA DE RATOS (C6) E
NEUROBLASTOMA DE CAMUNDONGOS (N2a)**

Péricles Arruda Mitozo

Orientador: Dr. Alcir Luiz Dafré

Departamento de Ciências Fisiológicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Florianópolis, 14 de junho de 2010

**“COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS DE DEGRADAÇÃO DE PERÓXIDOS EM
FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS, GLIOMA DE RATOS (C6) E
NEUROBLASTOMA DE CAMUNDONGOS (N2a)”.**

PÉRICLES ARRUDA MITOZO

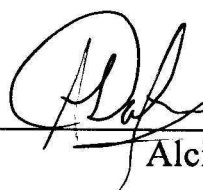
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurobiologia Celular e Molecular Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientador

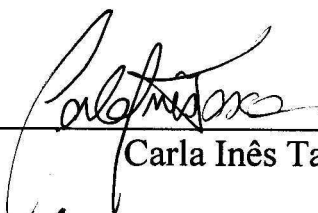
X



Alcir Luiz Dafré

Coordenadora do Curso

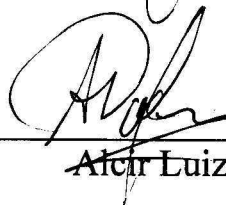
X



Carla Inês Tasca

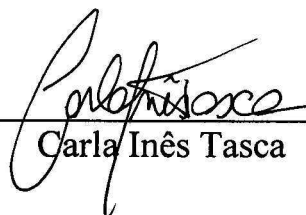
Banca Examinadora

X



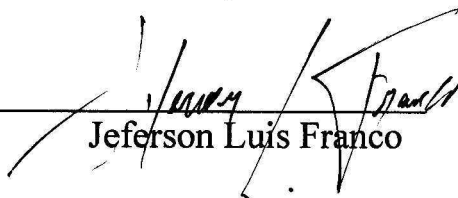
Alcir Luiz Dafré (Presidente)

X



Carla Inês Tasca

X



Jeferson Luis Franco

AGRADECIMENTOS

Prof. Alcir Luiz Dafré, por ter aceitado ser meu orientador e ter contribuído com seus ensinamentos, paciência e generosidade, além do grande apoio na realização desse trabalho.

Aos professores Carla Inês Tasca, Jeferson Luiz Franco e Vander Baptista por aceitarem participar da banca de avaliação.

Aos professores Adair Roberto Soares dos Santos e Odival Cesar Gasparoto, pelo apoio e incentivo em todos os momentos do curso de mestrado.

Gecioni Loch Neckel e Claudia Pinto Figueiredo, do Laboratório de Farmacologia Experimental (Lafex), Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB), da UFSC, pela doação das linhagens celulares, que foram fundamentais para a realização de grande parte dos experimentos.

Profª Angélica Francesca Maris, pelas sugestões e orientação na condução do teste do cometa.

Ao PPG em Neurociências e seus professores, que muito contribuíram para minha formação: Marcelo Farina, Yara Maria Rauh Müller, Mariana Graciela Terenzi, Rodrigo Bainy Leal, Ana Lúcia Severo Rodrigues, Alexandra Susana Latini,, Andréa Gonçalves Trentin, José Marino Neto.

Aos colegas do Laboratório de Defesas Celulares que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho: Luiz Souza, Carol, Naissa, Samira, Trevisan, Marcela, Mariana, Anderson.

Nivaldo, da secretaria da PPG de Neurociências, pelo seu grande espírito colaborador.

Ao Biotério Central da UFSC, pelo fornecimento dos animais utilizados nos experimento.

À direção do CCB, em nome da professora. Sônia Gonçalves Carobrez, e ao Departamento de Ciências Fisiológicas, em nome da professora Laura Difini Leite, por permitirem o meu afastamento nos últimos três meses para a conclusão desse trabalho.

À UFSC, como instituição de ensino e pesquisa, sem a qual não seria possível a realização desse trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, que participaram do financiamento desse projeto: FAPESC, CNPq, CAPES, INCTEN (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção) e Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net # 01.06.0842-00).

Aos meus pais, em especial à minha mãe, Judith, e ao meu pai Benito.

A minha grande companheira de todos os momentos, Fátima, pelo carinho e incentivo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, e aos meus filhos, Filipe, Adriana e Gabriela, por estarem presente na minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	01
1.1. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	01
1.2. Superóxido dismutase.....	03
1.3. Catalase.....	05
1.4. Sistema da Glutathione.....	06
1.5. Sistema da Tiorredoxina.....	11
1.6. Peroxirredoxina.....	12
1.7. Peróxido de hidrogênio.....	17
1.7.1. Peróxido de hidrogênio e sinalização celular.....	19
1.8. Peróxido de cumeno.....	22
1.9. Fatias de hipocampo.....	22
1.10. Linhagens de células de glioma de rato (C6).....	23
1.11. Linhagem de células neuroblastoma de camundongos (N2a).....	24
2. Justificativa.....	26
3. Objetivos.....	28
3.1. Objetivos gerais.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. Materiais e Métodos.....	29
4.1. Reagentes e materiais.....	29
4.2. Equipamentos.....	30
4.3. Animais.....	30
4.4. Fatias de hipocampo de ratos.....	30
4.5. Culturas celulares.....	31
4.6. Tratamentos.....	32
4.6.1. Fatias de hipocampo de ratos.....	32
4.6.2. Células C6 e N2a.....	33
4.7. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, GR e TrxR em fatias de hipocampo de ratos após pré-incubação com inibidores.....	33
4.7.1. Glutathione redutase (GR).....	34
4.7.2. Tiorredoxina redutase (TrxR).....	34
4.7.3. Catalase (CAT).....	35
4.8. Curvas de consumo de peróxidos – PCA-FOX.....	35
4.8.1. Consumo de peróxidos.....	35
4.9. Avaliação da viabilidade celular, pela redução do MTT.....	36
4.10. Avaliação da permeabilidade das membranas, pela incorporação do IP.....	36
4.11. Avaliação de danos ao DNA , pelo ensaio do cometa.....	37
4.12. Identificação das Prx-2 e Prx-SO3 em células C6 e N2a, por imunodeteção.....	40
4.13. Análise estatística.....	41
4.14. Proteínas.....	42
5. Resultados.....	42
5.1. Efeito do BCNU, CDNB e AT na atividade das enzimas glutathione redutase, tiorredoxina redutase e catalase em fatias de hipocampo de ratos.....	42
5.2. Determinação das condições experimentais através da viabilidade celular em fatias de hipocampo expostas ao peróxido de hidrogênio em diversas concentrações.....	44
5.3. Degradação de peróxidos.....	46

5.4. Efeito do AT na degradação de peróxido de hidrogênio em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a.....	50
5.5. Efeito do BCNU e do CDNB na degradação de peróxido de hidrogênio em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a.....	52
5.6. Efeito do BCNU e do CDNB na degradação de peróxido de cumeno em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a.....	55
5.7. Efeito do AT na viabilidade celular em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio.....	58
5.8. Efeito do BCNU e do CDNB na viabilidade celular em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio e de cumeno.....	60
5.9. Efeito do AT na permeabilidade celular em fatias de hipocampo, células C6 ou células N2a expostas ao peróxido de hidrogênio.....	64
5.10. Efeito do BCNU e do CDNB na permeabilidade celular em fatias de hipocampo, células C6 e células N2a expostas agudamente ao peróxido de hidrogênio ou de cumeno.....	66
5.11. Efeito do AT sobre o índice de danos ao DNA em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio.....	69
5.12. Efeito do BCNU e do CDNB sobre o índice de danos ao DNA, pelo ensaio do cometa, em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio ou de cumeno.....	71
5.13. Efeito do BCNU e do CDNB na oxidação e superoxidação da peroxirredoxina em células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio.....	74
6. Discussão.....	78
6.1. Inibição da catalase.....	78
6.2. Inibição da glutathiona redutase (GR).....	81
6.3. Inibição da tioredoxina redutase (TrxR).....	83
6.4. Inibição simultânea da GR e da TrxR.....	85
6.5. Dimerização e superoxidação da Prx-II.....	88
7. Conclusões.....	91
8. Referências bibliográficas.....	93

RESUMO

As células produzem continuamente espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e outras moléculas oxidantes, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos que podem causar danos às membranas celulares, às proteínas e ao DNA. Muitas dessas moléculas estão relacionadas a diversas enfermidades, como câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas. Para eliminação dessas substâncias, os organismos possuem defesas não enzimáticas, como a glutatona, a vitamina C e a vitamina E, e enzimáticas, que entre outras incluem as enzimas catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e peroxirredoxina (Prx). A CAT degrada exclusivamente o H_2O_2 , enquanto a GPx e a Prx degradam, além do H_2O_2 , diversos tipos de peróxidos orgânicos. A GPx utiliza a glutatona (GSH) durante sua atividade, produzindo a glutatona oxidada (GSSG), que por sua vez é regenerada pela enzima glutatona redutase (GR). Na degradação de peróxidos, a Prx fica oxidada e é regenerada pela tiorredoxina (Trx), que se oxida e retorna ao seu estágio reduzido pela ação da enzima tiorredoxina redutase (TrxR). O objetivo desse trabalho foi avaliar o envolvimento da CAT, GPx e Prx na degradação de peróxidos, utilizando fatias de hipocampo de ratos e linhagens de gliomas de ratos (C6) e neuroblastoma de camundongos (N2a). Nesse sentido, as fatias e as linhagens celulares foram tratadas previamente com AT (aminotriazol), inibidor da CAT, BCNU {1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosuréia}, inibidor da GR, e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) inibidor da TrxR, e em seguida expostas ao H_2O_2 e ao CuOOH (peróxido de cumeno). Foram avaliados a capacidade de degradação de peróxidos pelo método PCA-FOX, viabilidade celular, pela redução do MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio}, permeabilidade celular, pela incorporação do iodeto de propídeo (IP), e danos ao DNA, pelo teste do cometa. Nas linhagens celulares C6 e N2a a imunodeteção foi utilizada para identificar as formas reduzida, oxidada e superoxidada da Prx II. As fatias de hipocampo e as células C6 foram menos afetadas pela inibição do peróxido de hidrogênio do que as células N2a, mas esse tratamento reduziu a viabilidade das duas linhagens celulares e causou danos ao DNA nas células C6. A inibição da GR afetou mais as fatias de hipocampo e células C6, enquanto o CDNB afetou mais as células N2a. Os pré-tratamentos com os inibidores e posterior adição de peróxidos reduziram a viabilidade celular, aumentaram permeabilidade celular e danos ao DNA principalmente nas células C6 e N2a. Os resultados obtidos sugerem que tanto as fatias quanto as células C6 e N2a degradam com mais eficiência o H_2O_2 do que o CuOOH. A inibição da GR pelo BCNU, que compromete o sistema da GPx, afetou principalmente as fatias e as células C6, enquanto a inibição da TrxR pelo CDNB, que compromete o sistema da Prx, afetou fortemente a células N2a. As análises feitas por imunodeteção mostraram que as células C6 conseguem reciclar com eficiência a forma oxidada da Prx-II, evidenciada pela presença de monômeros (forma ativa), apesar de que essa enzima pode ser facilmente superoxidada em presença de H_2O_2 , isolado ou com os inibidores. Por outro lado, as células N2a não mantiveram as bandas totalmente reduzidas, como demonstraram o surgimento de bandas oxidadas e reduzidas, além da intensificação das bandas superoxidadas com a utilização de H_2O_2 e inibidores. Os dados obtidos demonstraram maior importância da GPx e da Prx e menor relevância da CAT na degradação de peróxidos, mas os resultados obtidos com a inibição da GR parecem indicar importância um pouco maior da GPx na degradação de peróxidos nas condições experimentais desse trabalho.

Palavras-chave: catalase, glutatona peroxidase, peroxirredoxina, peróxido de hidrogênio, peróxido de cumeno.

ABSTRACT

The cells continuously produce reactive oxygen species (ROS) and nitrogen reactive species (RNS) and as well as oxidizing molecules such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and organic hydroperoxides that can cause damage to cell membranes, proteins and DNA. Many of these molecules are related to various diseases such as cancer, diabetes and neurodegenerative diseases. To eliminate these substances, the bodies have non-enzymatic defenses such as glutathione, vitamin C and vitamin E, and enzymatic defenses, such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and peroxiredoxins (Prx). The CAT only degrades H_2O_2 , while GPx and Prx degrade, in addition to H_2O_2 , different types of organic hydroperoxides. The GPx uses glutathione (GSH) during their activity, producing the oxidized glutathione (GSSG), which in turn is regenerated by glutathione reductase (GR). During degradation of peroxides, the Prx is oxidized and is regenerated by thioredoxin (Trx), which oxidizes and returns to its reduced form by the action of the enzyme thioredoxin reductase (TrxR). The aim of this study was to evaluate the involvement of CAT, Gpx and Prx in the degradation of peroxides, using rat hippocampal slices, rat glioma (C6) and mice neuroblastoma (N2a) cells. In this sense, the slices and cell lines were previously treated with AT (aminotriazole), a CAT inhibitor, BCNU {1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea}, a GR inhibitor and CDNB (1-chloro- 2,4-dinitrobenzene) a TrxR inhibitor, and exposed to H_2O_2 or CuOOH (cumene hidroperoxide). Then we evaluated the ability to degrade peroxides to the PCA-FOX method, cell viability, by the MTT reduction {3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide} cell permeability, by the incorporation of propidium iodide (PI) and DNA damage by the comet assay. In cell lines C6 and N2a Western blot was used to identify the reduced, oxidized and superoxidized Prx II forms. Hippocampal slices and C6 cells were less affected by inhibition of hydrogen peroxide than N2a cells, but this treatment reduced the viability of both cell lines and caused damage to DNA in cells C6. Inhibition of GR affected more hippocampal slices and C6 cells, while the CDNB affected more N2a cells. Pretreatment with inhibitors and subsequent addition of peroxide decreased cell viability, increased cell permeability and caused DNA damage mainly in C6 and N2a cells. The results suggest that hippocampal slices, C6 and N2a cells degrade H_2O_2 more efficiently than CuOOH. Inhibition of GR by BCNU, which commits the GPx system, was mainly affected in slices and C6 cells, while inhibition of TrxR by CDNB, which commits the system of Prx, strongly affected the N2a cells. Western blot analyses showed that C6 cells can efficiently recycle the oxidized Prx-II form, as evidenced by the presence of monomers (active form), although this enzyme could be easily superoxidized in the presence H_2O_2 alone or with inhibitors. Moreover, N2a cells did not keep the Prx-II totally reduced, as shown by the appearance of dimérica forms in addition to the intensification of superoxidized bands using H_2O_2 and inhibitors. The data showed greater importance of GPx and Prx and less relevance of CAT in degrading peroxides, but the results obtained with inhibition of GR seem to indicate a slightly greater importance of GPx in the degradation of peroxides in the experimental conditions of this work.

Key words: catalase, glutathione peroxidase, peroxiredoxin, hydrogen peroxide, cumene hydroperoxide.

1. Introdução

1.1. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

A utilização do oxigênio na produção mais eficiente de energia permitiu o surgimento de organismos multicelulares complexos no ambiente terrestre. A maioria desses organismos utiliza o oxigênio como receptor final da cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, para produzir trifosfato de adenosina (ATP) como fonte dessa energia. As células de mamíferos utilizam mais de 80% desse ATP mitocondrial na manutenção de suas atividades metabólicas. No entanto, ao mesmo tempo em que a utilização do oxigênio permitiu melhor aproveitamento de energia, trouxe desvantagens, pois muitas espécies reativas originárias do seu metabolismo podem causar danos celulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas continuamente durante o metabolismo aeróbico, mas também advêm da exposição ambiental a substâncias produtoras dessas espécies. Entre esses agentes estão os radicais livres, que são átomos ou moléculas que contém um ou mais elétrons isolados na sua órbita mais externa, como o radical hidroxila (OH^\bullet), o radical peroxila (HO_2^\bullet) e o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Esta característica radicalar os torna muito instáveis e faz com que se combinem rapidamente com muitos componentes celulares. Outras moléculas oxidantes que não possuem estrutura radicalar também são originárias do oxigênio, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985, 2007).

As reações entre ERO ou de ERO com outras moléculas originam espécies reativas secundárias, como o peroxinitrito (ONOO^-), denominado espécie reativa do nitrogênio (ERN), produzido a partir da combinação do óxido nítrico (NO) com o radical superóxido (JENSEN, 2003).

O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção e a eliminação de oxidantes pelo organismo (CHONG *et al.*, 2005). A mitocôndria é uma das principais produtoras de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas células de mamíferos. Quando

sua produção é excessiva, pode haver danos mitocondriais, observados em diversas patologias, como Alzheimer e Parkinson. (MURPHY, 2009).

A fosforilação oxidativa, que ocorre na mitocôndria, é feita por quatro complexos enzimáticos, dos quais, o complexo I (NADH-ubiquinona redutase) e o III (citocromo c redutase) são considerados os maiores produtores de radical superóxido (RAHA e ROBINSON, 2000). No entanto, a eficiência da cadeia transportadora de elétrons faz com que sua produção seja pequena. Apenas entre 1% a 2% dos elétrons que atravessam a cadeia transportadora escapa desses complexos e se combina com o oxigênio molecular para formar espécies reativas (BOONSTRA e POST, 2004).

Os níveis das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio mantêm-se estável durante o metabolismo normal, mas suas concentrações podem ficar elevadas durante condições patológicas ou quando o organismo é submetido a agentes estressores, tais como xenobióticos e radiações ionizantes (SIES, 1997). As reações entre essas espécies e os componentes celulares causam danos aos ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos das membranas (JENSEN, 2003). Há evidências do seu envolvimento na isquemia/reperfusão (WHITE *et al.*, 2000) inflamação, diabetes, câncer, doenças degenerativas e envelhecimento (WINYARD *et al.*, 2005).

Os organismos aeróbicos estão em contato permanente com grande variedade de oxidantes de diversas origens. Se por um lado a exposição a níveis elevados de oxidantes ou a capacidade reduzida de metabolizar estes agentes podem resultar em danos aos constituintes celulares, alterações moderadas na homeostase redox normalmente iniciam uma resposta que leva a uma variedade de efeitos, incluindo o aumento na expressão de enzimas de proteção e reparo (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008). Oxidantes endógenos agem como segundo mensageiros sinalizando para mudanças proliferativas ou metabólicas associadas, ativando ou desativando fatores de transcrição, canais de membrana e enzimas, além de modular as vias de sinalização dependentes de cálcio (VEAL *et al.*, 2007).

Os seres vivos, ao longo da evolução, desenvolveram mecanismos adaptativos que lhes permitiram co-existir com a exposição aos oxidantes. As defesas contra esses agentes envolvem diversos mecanismos, como os de prevenção e reparo, em que estão incluídas as defesas antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Entre as defesas não enzimáticas estão a glutatona (GSH), que possui espectro de ação amplo contra o estresse oxidativo (DRINGEN, 2000), o ácido ascórbico (vitamina C), que auxilia na eliminação de diversos oxidantes (MEISTER, 1994), o α -tocoferol (Vitamina E), que protege a membrana celular contra a lipoperoxidação (SIES, 1997), além de substâncias antioxidantes encontradas em vegetais, como flavonóides e carotenóides (HALLIWELL *et al.*, 1995; MARTINDALE e HOLBROOK, 2002).

Das defesas enzimáticas fazem parte a enzima superóxido dismutase (SOD), que possui função importante na proteção contra o radical superóxido, formando o peróxido de hidrogênio, que é eliminado pela catalase (CAT) (BAUD *et al.*, 2004). Na reação contra os peróxidos atuam também a glutatona peroxidase (GPx) (DRINGEN *et al.*, 2005), a tiorredoxina redutase (TrxR) (ARNÉR e HOLMGREN, 2000) e peroxirredoxina (Prx) (RHEE *et al.*, 2003).

1.2. Superóxido dismutase.

A maior parte do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido pelo organismo é eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD). Esse radical pode reagir com os componentes celulares e formar outros tipos de espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila (OH^{\bullet}). A SOD dismuta o $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de oxigênio (H_2O_2), que também é muito reativo e pode causar danos às membranas celulares. O H_2O_2 produzido pela SOD é convertido em oxigênio e água pela Catalase (CAT), ou outras peroxidases (DRINGEN, 2000; MAIER e CHAN, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

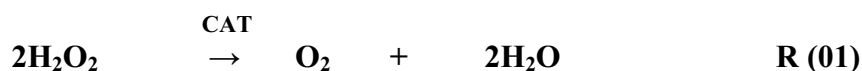
Foram identificados três tipos da enzima SOD nos mamíferos. A Cu/Zn-SOD (SOD1), citoplasmática, a Mn-SOD (SOD-2), mitocondrial, e a EC-SOD (SOD-3), extracelular, que também possui na sua composição o cobre e o zinco. As SOD1 e a SOD2 estão distribuídas de formas diferentes em neurônios e células gliais. A SOD-1 localiza-se principalmente nos astrócitos em todo o sistema nervoso central, mas já foi detectada nos neurônios, enquanto a SOD-2 é encontrada predominantemente nos neurônios. A SOD3 é a única isoforma da SOD liberada da célula para o espaço extracelular. (MAIER e CHAN, 2002; JOHNSON e GIULIVI, 2005).

SOD1 catalisa a dismutação do superóxido no citoplasma, mas também é encontrada nos peroxissomas e núcleo celular (MAIER e CHAN, 2002). A presença do cobre na SOD1 tem a função de facilitar a transferência de elétrons durante sua atividade catalítica, (ERMILOVA *et al.*, 2005) enquanto o zinco é essencial para manter sua estrutura (JOHNSON e GIULIVI, 2005). A deficiência do zinco na SOD1 está relacionada à doença esclerose lateral amiotrófica (ELA), em que há degeneração dos neurônios motores, que controlam os movimentos involuntários do corpo. Quando a afinidade pelo zinco é reduzida nessa doença, a função catalítica da SOD1 é alterada, fazendo com que a enzima passe a transferir elétrons do ascorbato para o oxigênio, produzindo o radical superóxido, tornando-se tóxica para os neurônios motores (ERMILOVA *et al.*, 2005)

A SOD-2 é encontrada exclusivamente na matriz mitocondrial e é vital para a proteção dos organismos aeróbicos contra os efeitos tóxicos do oxigênio. (HOLLEY *et al.*, 2010). A SOD-3 se expressa em grande quantidade nos vasos da musculatura lisa e é responsável pela biodisponibilidade do óxido nítrico. Acredita-se que tenha função importante na biologia vascular cerebral. Sua baixa atividade está relacionada a disfunções vasomotoras (JOHNSON e GIULIVI, 2005).

1.3. Catalase

A catalase (240 kDa) nos mamíferos é uma enzima formada por quatro subunidades e está localizada principalmente nos peroxissomas. Ela catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (PUTNAM *et al.*, 2000).



Sua função inclui também a destoxificação de outros substratos, como fenóis e álcoois, por meio de reduções acopladas ao peróxido de hidrogênio (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Os níveis de catalase são diferentes nas diversas regiões do organismo. Níveis mais altos são encontrados no fígado, rins e sangue, enquanto sua atividade é reduzida no tecido conjuntivo e no cérebro. A deficiência da enzima (acatalasemia) pode levar ao aparecimento de gangrena e atrofia da boca (CHEN *et al.*, 2004). Trabalhos feitos em cultura primária de astrócitos demonstraram que a catalase atua em conjunto com a GPx na eliminação do peróxido de hidrogênio (DRINGEN e HAMPRECHT, 1996). No entanto, na ausência da GPx, a atividade da catalase é rapidamente perdida, comprometendo o sistema de defesa antioxidante (SOKOLOVA *et al.*, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que o aminotriazol (AT) pode inibir com eficiência a CAT, aumentando a suscetibilidade celular a oxidantes (HERMANN *et al.*, 1997; WARD *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2007). Estudos feitos em camundongos que não expressam a CAT mostraram que esses animais tiveram desenvolvimento normal. No entanto, a mitocôndria do cérebro desses animais foi mais vulnerável aos danos causados durante a fosforilação oxidativa do que em animais selvagens, além de apresentarem variações na capacidade de remoção de peróxido de hidrogênio em diversas regiões do organismo (HO *et al.*, 2004).

1.4. Sistema da Glutathiona

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (γ -glutamilcisteinilglicina). Sua síntese envolve duas enzimas em reações consecutivas: a γ -glutamato-cisteína ligase (GCL) utiliza o glutamato e a cisteína para formar o dipeptídeo γ -GluCys, que é adicionado à glicina pela enzima glutathiona sintetase (MEISTER, 1994; SIES, 1997) (Figura 1).

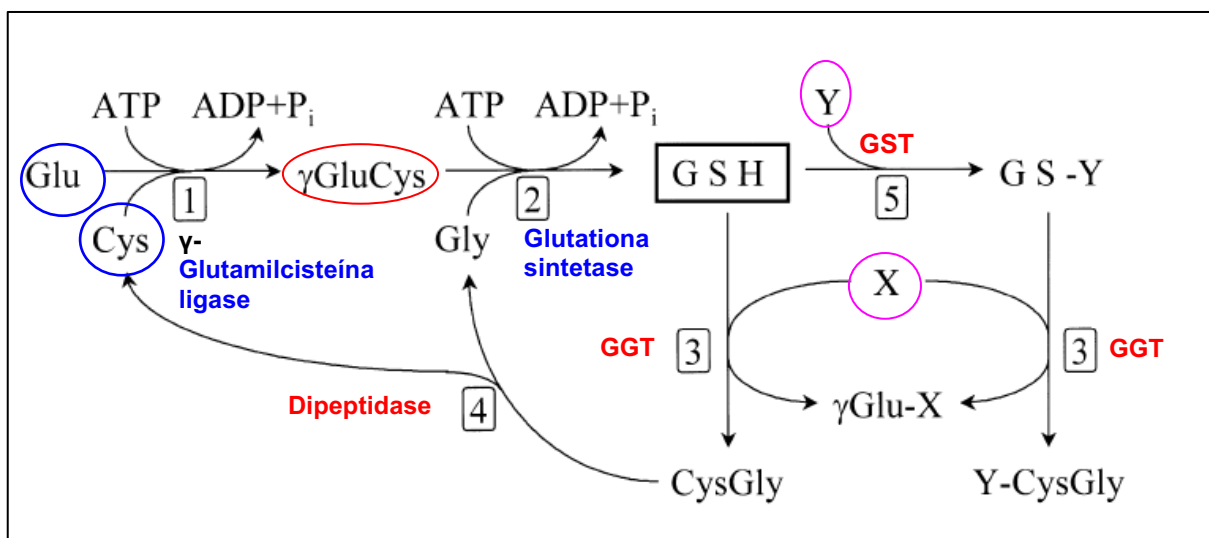


Figura 1. Metabolismo da glutathiona. A GSH é sintetizada por duas reações consecutivas que envolvem o consumo de ATP. (1) γ -glutamato-cisteína ligase e (2) glutathiona sintetase. A GSH é substrato para a ectoenzima (3) γ -glutamyl transpeptidases (GGT). No esquema, γ -glutamyl retirada da GSH pela GGT é transferida para um aminoácido aceptor (representado por X). O dipeptídeo CysGly é produzido em quantidade equimolar à de GSH utilizada na reação pela GGT. Peptidases podem agir, hidrolisando os peptídeos (4), como, por exemplo, dipeptidases. A GSH intracelular é conjugada pela (5) glutathiona S-transferase à substâncias eletrofílicas, em geral xenobióticos ou compostos endógenos (representado por Y). Estes conjugados também são substratos da GGT. (Adaptado de DRINGEN, 2000).

Na eliminação de espécies reativas de oxigênio, a GSH pode atuar diretamente em reações não enzimáticas com os radicais superóxido e hidroxila ou mesmo com o óxido nítrico, da mesma forma que pode ser doadora de elétrons nas reações de redução de peróxidos feitas pela glutathiona peroxidase (GPx). Como resultado, forma-se a glutathiona oxidada (GSSG), que é substrato da enzima glutathiona redutase (GR), que transfere elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) para a GSSG, formando

novamente a GSH. Nesse processo, a GSH não é consumida, mas sim reciclada continuamente (Figura 3). Assim, para manter o funcionamento da GPx e eliminar peróxidos de hidrogênio ou orgânicos, é fundamental que a reciclagem da GSSG para GSH seja eficiente (SCHAFER e BUETTNER, 2001; MAULIK e DAS, 2008)

A GSH possui diversas funções na célula. Participa do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática e da regeneração do ácido ascórbico. Mantém os grupos sulfidrilas de proteínas na sua forma reduzida, estabelecendo equilíbrio redox celular (MEISTER, 1994; VALKO *et al.*, 2007).

A concentração da GSH no cérebro oscila entre 1 e 3 mM e é encontrada principalmente nos astrócitos. Sua concentração pode chegar a 12 mM no fígado. Acredita-se que seus níveis sejam mantidos por meio da reciclagem de seus precursores, como glutamina e cisteína, que podem ser transportados através da barreira hematoencefálica (DRINGEN, 2000). Alterações nos níveis de GSH estão relacionadas a várias doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (WOLTJER, *et al.*, 2005; VÖLKEL *et al.*, 2006).

Diversas enzimas participam do ciclo que envolve a glutathione. Durante a produção de S-conjugados de glutathione, pela glutathione-S-transferase (GST), ou quando há liberação pelas células, a quantidade intracelular de GSH pode diminuir. Para manter níveis satisfatórios, ela é novamente sintetizada a partir da GSH extracelular e de seus conjugados num sistema que envolve a enzima γ -glutamyltranspeptidase (GGT). Xenobióticos e outras substâncias provenientes de diversos processos celulares podem ser substratos da GST (DRINGEN, 2000) (Figura 1).

A glutathione peroxidase (GPx) atua na eliminação do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (NORDBERG e ARNÉR, 2001; HOU *et al.*, 2004). Dos seis tipos conhecidos da GPx em mamíferos, cinco possuem selenocisteína na sua constituição: GPx 1, citosólica, Gpx 2, gastrointestinal, Gpx3, plasmática, Gpx 4, que degrada hidroperóxido fosfolípido, e GPx 6, encontrada no sistema olfatório humano. A Gpx5 se expressa no

epidídimo de roedores e de alguns primatas e contém cisteína no lugar de selenocisteína. As diversas enzimas GPx em mamíferos adotaram diferentes funções. A GPx-1 tem atividade bem direcionada para equilibrar o estresse oxidativo celular, enquanto as funções mais específicas são realizadas pelos demais tipos (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2006).

A GPx-2 é um constituinte do fator nuclear Nrf2, o mais importante regulador da resposta antioxidante celular, que atua contra a formação de tumores malignos e na resposta inflamatória (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2006). A síntese e secreção da GPx-3 no fígado tem sugerido sua importância para proteção desse órgão, mas essa enzima também é encontrada em outros tecidos, como intestinos, pulmão, líquido amniótico, tireóide e diversos tipos celulares, indicando sua ação em diferentes situações (ARTHUR, 2000). A Gpx-4 bloqueia o fator nuclear NF- κ B e com isso inibe a biossíntese de leucotrienos e prostraglandinas, controlando também a inflamação (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2006). Muitas das patologias que envolvem deficiências do selênio parecem estar associadas a danos oxidativos nos tecidos e à diminuição da atividade da GPx-1 (ARTHUR, 2000; BRIGELIUS-FLOHÉ, 2006).

O mecanismo catalítico da maioria das GPx envolve a oxidação da selenocisteína do seu sítio ativo, onde o selenolato (Se^-) é oxidada a ácido selênico (Se-OH). O ataque nucleofílico da GSH ao Se-OH produz o sulfeto selenil (Se-SG) que reage com a GSH para regenerar o selenolato (MUGESH e MONT, 2001) (figura 2).

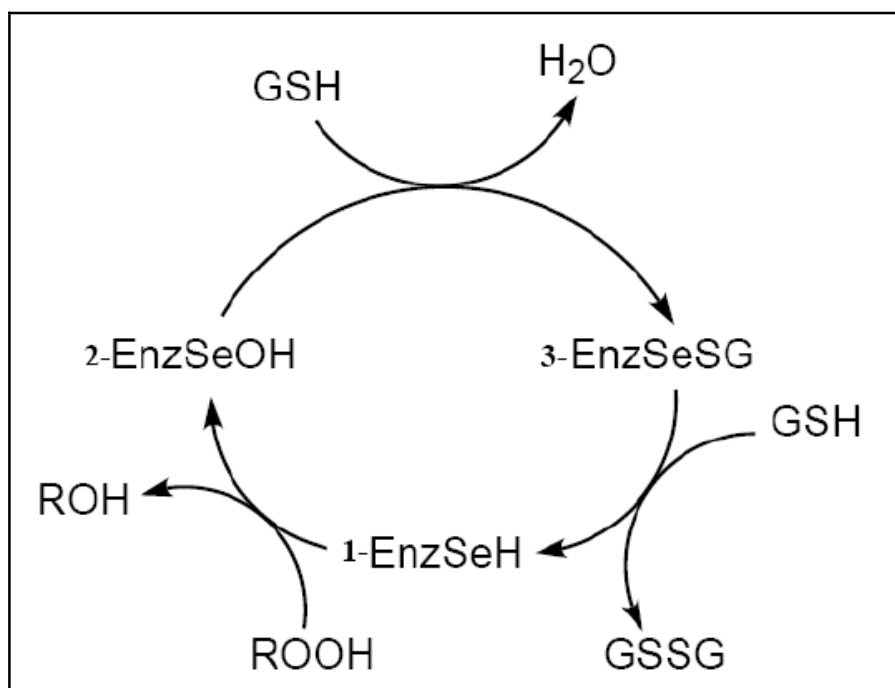


Figura 2. Ciclo catalítico da glutatona peroxidase (GPx). O selenolato (**1-EnzSe-H**) reage com peróxidos e forma o ácido selênico (**2-EnzSe-OH**). O ataque nucleofílico da GSH ao ácido selênico produz o sulfeto selenil (**3-EnzSeSG**), que reage com a GSH, regenerando o selenolato (Retirado de MUGESH e MONT, 2001).

A enzima glutatona redutase (GR) é um homodímero formado por subunidades com peso molecular de 55 kDA. Como enzima do ciclo redox da glutatona, está envolvida nos mecanismos de proteção contra hidroperóxidos endógenos e exógenos. Sua natureza dimérica é essencial na função catalítica, pois as duas subunidades trabalham em conjunto. Na primeira fase da reação de redução o grupo prostético (FAD) da GR é reduzido pelo NADPH, que transfere seus elétrons para o sítio dissulfeto ativo. Na segunda fase, o tiol resultante reage com a GSSG, onde seu elétron aceitor final é reduzido a duas GSH (TANDOGAN e ULUSU, 2006). (figura 3).

O BCNU {1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosuréia}, droga utilizada em linfomas e tumores cerebrais, é um importante inibidor da GR. A capacidade antitumoral do BCNU está relacionado à sua atividade alquilante e sua grande afinidade por grupos sulfidrilas, comprometendo o sistema da glutatona (WHITE *et al.*, 1999). A inibição da GR está

associada ao aumento do estresse oxidativo celular (TRETTER *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2009).

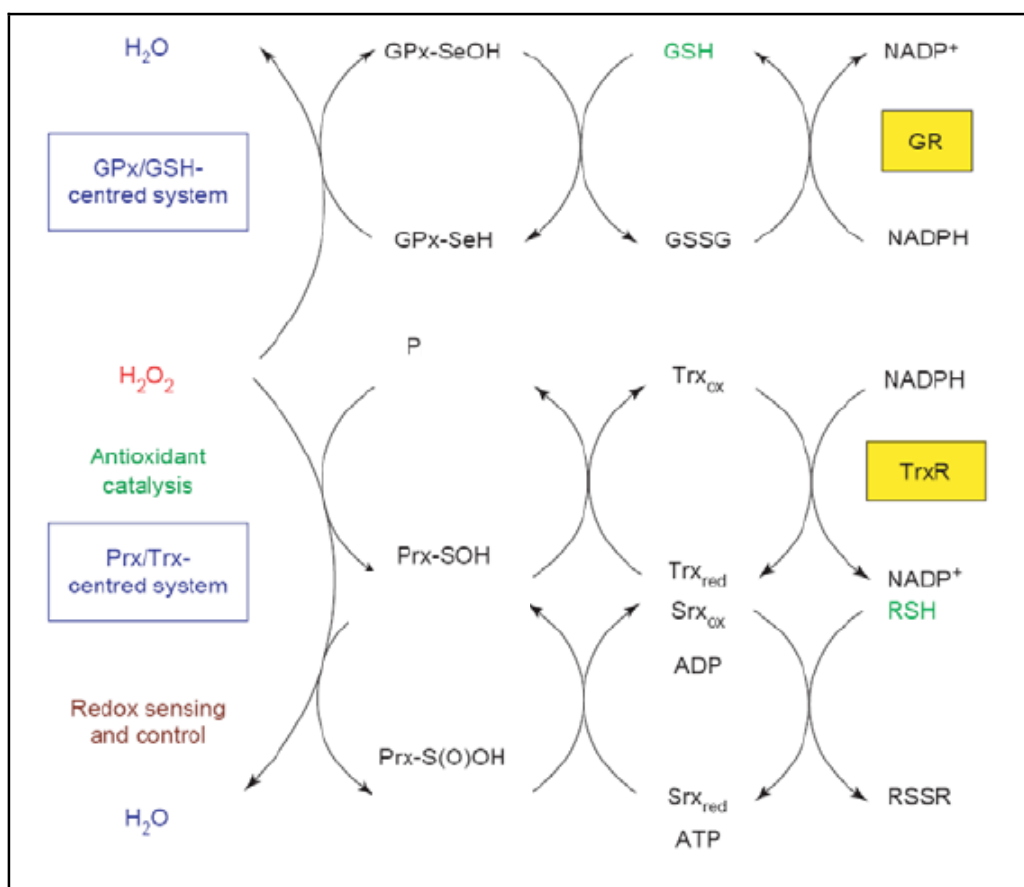


Figura 3. Sistemas antioxidantes envolvendo a GR e TrxR. O esquema mostra os sistemas antioxidantes da GPx e Prx, os quais dependem da regeneração de seus substratos GSH pela GR e Trx pela TrxR, respectivamente, para manter o seu funcionamento na degradação de peróxidos (H_2O_2 como exemplo). A TrxR pode reduzir diferentes proteínas – a Prx é apenas um exemplo. A sulfirredoxina (Srx) faz a redução do ácido sulfínico da Prx [Prx-S(O)OH] a ácido sulfênico (Prx-SOH), e posterior redução pela TrxR. (Adaptado de WINYARD *et al.*, 2005)

A glutathione-S-transferase (GST) é encontrada em diversos organismos. Nos seres humanos ocorre nos microsossomos e no citoplasma. A GST microsossomal atua no metabolismo dos leucotrienos e prostaglandinas. Ela catalisa a conjugação da GSH a uma grande variedade de componentes eletrofílicos endógenos e exógenos, tornando-os mais solúveis para que possam ser eliminados pela célula. Pode ser induzida por substâncias que produzam estresse químico ou que sejam carcinogênicos, como compostos aromáticos, inseticidas, herbicidas, além de medicamentos (TOWNSEND *et al.*, 2003).

1.5. Sistema da Tiorredoxina

O sistema da tiorredoxina é formado pela tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TrxR) e NADPH e atua na defesa contra agentes oxidantes presentes nas células (ARNÉR e HOLMGREN, 2000). As Trx são pequenas proteínas (12 kDa) que em humanos compreendem três isoformas, codificadas por três genes diferentes. A Trx-I citosólica ocorre citoplasma e núcleo, mas também é encontrada no meio extracelular. No meio extracelular está envolvida na resposta inflamatória, no citoplasma regula o estado redox e a proteína ASK-1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), relacionada a apoptose, e no núcleo interage com diversas proteínas que modulam a transcrição gênica. A Trx-II mitocondrial se expressa em vários tipos celulares, mas sua presença é maior em regiões de alta atividade metabólica, como células do estômago, testículos, ovários, coração glândula adrenal e nos neurônios. Ela é importante na ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear κ B) e da apoptose. A terceira isoforma, SpTrx, ocorre em maior quantidade no espermatozóide (WILLIAMS *et al.*, 2000; MAULIK e DAS, 2008).

A Trx passa por um processo reversível de oxido-redução de dois grupos de cisteína. Sua forma reduzida [Trx-(SH)₂] atua em proteínas que possuem grupamentos sulfidríla oxidados à forma dissulfeto. Ao reduzir estes grupamentos tióis, a Trx se torna oxidada [TX-(S-S)]. A redução da forma dissulfeto da Trx é realizado pela TrxR, numa reação dependente de NADPH (WILLIAMS *et al.*, 2000; BIAGLOW e MILLER, 2005) (Figura 3).

A enzima TrxR dos mamíferos faz parte da família das flavoenzimas diméricas (112-130 kDa). Possui um sítio catalítico (Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys) e um sítio de ligação com o NADPH, além de uma sequência C-terminal contendo Cys-selenocisteína que se comunica com o sítio catalítico, essencial para sua atividade redox (WILLIAMS *et al.*, 2000; BIAGLOW e MILLER, 2005). Ela compartilha com a GR e outras enzimas similares o mesmo nucleotídeo pirimidina, responsável pela oxido-redução. Mas ao invés de reduzir um substrato em solução, como faz a GR, o sítio ativo da TrxR ligado ao selênio pode reduzir

vários substratos, incluindo proteínas e pequenas moléculas que possuem pontes dissulfeto e compostos que não sejam dissulfetos (ARNÉR e HOLMGREN, 2000).

O CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), composto eletrofílico que reage com grupos sulfidrilas por meio da alquilação, é um inibidor irreversível da TrxR em baixas concentrações. A inibição ocorre somente depois da redução do sítio ativo sulfidrilas pelo NADPH (ARNÉR *et al.*, 1995). A diminuição da atividade da tioredoxina reduz as defesas antioxidantes *per se*, mas também compromete o sistema da peroxirredoxina (FLOHÉ e HARRIS, 2007).

Foram encontradas concentrações elevadas de TrxR e Trx-I no citoplasma de neurônios, células de Schwann e nodos de Ranvier de ratos. Ambas se acumularam em axônios dilatados após indução de danos mecânicos. A acumulação foi bloqueada por agentes que desestabilizam microtúbulos, sugerindo que há transporte retrógrado e anterógrado dessas proteínas nos axônios (FLOHÉ e HARRIS, 2007).

Ratos transgênicos com expressão acentuada de Trx, quatro vezes mais do que o normal em diversos tecidos, incluindo o encéfalo (neurônios piramidais, hipocampo, córtex, camada endotelial vascular e células gliais), tiveram maior longevidade em relação aos ratos selvagens, além de serem mais resistentes à isquemia focal e ao estresse citotóxico induzido por kainato no hipocampo (FLOHÉ e HARRIS, 2007). Por outro lado, foram encontrados níveis muito baixos de TrxR em pacientes com mal de Alzheimer (LOVELL *et al.*, 2000).

1.6. Peroxirredoxina

As peroxirredoxinas (Prx) são enzimas que possuem ampla atividade antioxidante e decompõem compostos como peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e grande variedade de peróxidos orgânicos. Estão presentes em vários organismos (plantas, leveduras, bactérias, helmintos, mamíferos) nos mais diversos compartimentos celulares (citossol, núcleo, mitocôndria). As peroxirredoxinas não possuem grupos prostéticos nem utilizam metais de

transição durante sua reação metabólica (IMMENSCHUH e BAUNGART-VOGT, 2005; JÖNSSON e LOWTHER, 2007).

Em humanos foram identificadas seis isoformas da Prx (PrxI-PrxVI). Elas são divididas em dois grupos, de acordo com o número de resíduos de cisteína envolvidos diretamente na ação catalítica: peroxirredoxinas 1-Cys e 2-Cys. Ambas as categorias possuem em comum a primeira reação que ocorre durante a peroxidação, onde a cisteína peroxidática (Cys-S_PH) ataca o substrato peróxido e é oxidada a ácido sulfênico (Cys-S_POH). A forma de regeneração do ácido sulfênico diferencia as peroxirredoxinas 1-Cys e 2-Cys (WOOD *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 2005).

A Prx do tipo 1-Cys (Prx-VI) é encontrada no citosol e possui apenas a cisteína peroxidática. O ácido sulfênico produzido na reação com peróxidos é reduzido por grupamentos tiólicos doadores de elétrons, tais como glutatona, ácido lipóico e ciclofilinas (WOOD *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 2005) (Figura 4).

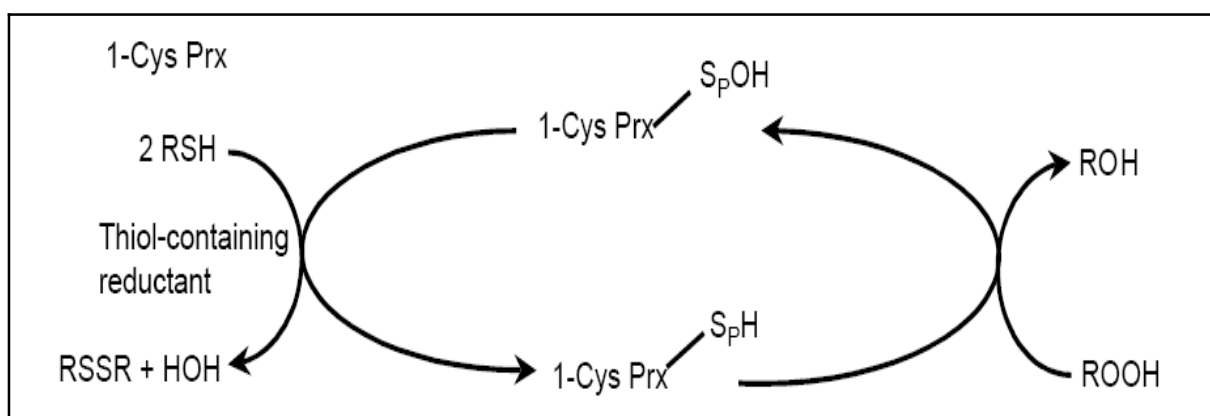


Figura 4. Reação das peroxirredoxinas 1-Cys. Essa Prx possui mecanismo de redução diferente das outras Prx, pois conserva apenas a cisteína peroxidática, que é reduzida por grupamentos tiólicos de baixo peso molecular (Retirado de WOOD *et al.*, 2003).

As Prx 2-Cys são subdivididas em duas classes, denominadas típicas (Prx I-IV) e atípicas (Prx-V) e as reações de peroxidação compreendem duas etapas, centralizadas na cisteína com atividade redox, a cisteína peroxidática.

As Prx 2-Cys típicas são: Prx-I, encontrada no citoplasma e núcleo, a Prx-II presente também no citoplasma e nas membranas, a Prx-III, mitocondrial, e a Prx-IV, que ocorre no citoplasma e no complexo de Golgi. A Prx 2-Cys atípica, a Prx-V, é encontrada no citoplasma, na mitocôndria e nos peroxisomas (SHUVAEVA, *et al.*, 2009).

As Prx típicas, mais numerosas, são identificadas pela presença de dois pares de cisteína com atividade redox ativas: cisteína peroxidática e a cisteína de resolução. São homodímeros que possuem dois sítios ativos idênticos em cada subunidade. Nelas, na segunda etapa da reação de peroxidação, o ácido sulfênico formado na região N-terminal de uma subunidade é atacada pela cisteína de resolução localizada na região C-terminal da outra subunidade. A Prxs 2-Cys atípica possui o mesmo mecanismo de ação das típicas, mas são monoméricas, onde a cisteína peroxidática e a cisteína de resolução estão no mesmo polipeptídeo. Com a reação de condensação, ocorre a formação de uma ligação dissulfeto intramolecular. Dessa reação de condensação que ocorre nessas duas classes de Prx, forma-se uma subunidade com ligação dissulfeto estável, que é então reduzida principalmente pela tioredoxina. Em diferentes espécies, o ácido sulfênico da Prx também pode ser reduzido por outras oxirredutases como AhpF, AhpD (alquil hidroperoxidases) e triparredoxina, completando o ciclo catalítico (WOOD *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 2005) (Figura 5).

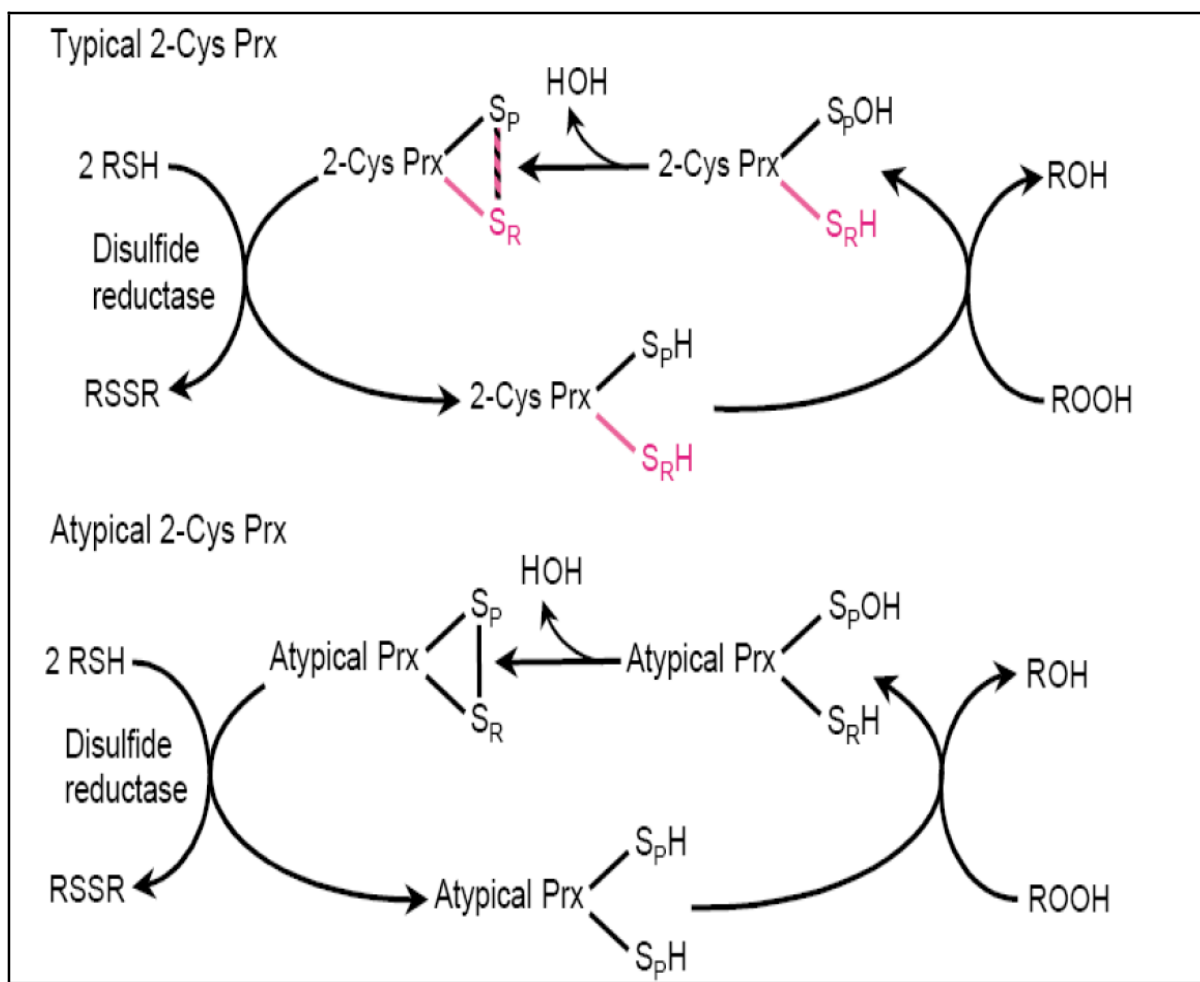


Figura 5. Reação das peroxirredoxinas típicas 2-Cys e atípicas 2-Cys. Nas Prx 2-Cys típicas, a cisteína peroxidática (S_P em preto) e a cisteína de resolução (S_R rosa) estão localizadas em subunidades diferentes e se combinam para formar uma ponte dissulfeto que une as duas subunidades (barra listrada de preto e rosa). A Prx atípica 2-Cys possui as duas cisteínas na mesma subunidade (S_P - S_R) e formam uma ponte estável entre elas. A redução dessas enzimas é feita principalmente pela Trx, mas pode ocorrer também por meio de outras oxirredutases (Retirado de WOOD *et al.*, 2003).

Nas Prx típicas e atípicas os resíduos de cisteína estão distante ente si na molécula (~ 13 Å) e a formação de um dissulfeto intermolecular é um processo lento (WOOD *et al.*, 2003). Portanto, em concentrações maiores de peróxidos, o ácido sulfênico (Cys-SOH) pode ser oxidado a ácido sulfinico (Cys-SO₂H) ou ácido sulfônico (Cys-SO₃H), que não podem ser reduzidos pela Trx, tornando as peroxirredoxinas cataliticamente inativas. A superoxidação da Prx ocorre somente durante o seu ciclo catalítico, quando há presença de H₂O₂ e do ciclo da Trx (YANG *et al.*, 2002) (figura 6).

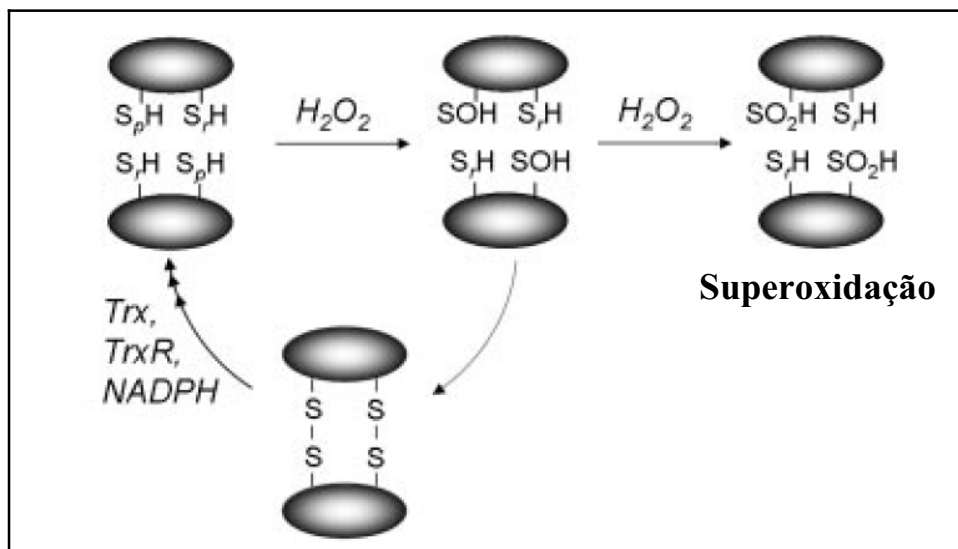


Figura 6. Esquema da oxidação e superoxidação da Prx-II pelo H_2O_2 . Concentrações de $100\ \mu M$ de H_2O_2 podem levar a superoxidação da Prx-II. S_pH indica cisteína peroxidática e S_rH , cisteína de resolução (Retirado de LOW *et al.*, 2007).

A superoxidação da Prx era considerada um processo irreversível. No entanto, Woo e colaboradores (2003a; 2003b) demonstraram, utilizando diversos tipos celulares de mamíferos expostos ao peróxido de hidrogênio para induzir sulfinilação, a habilidade dessas células em reduzir o ácido sulfinico, revertendo o processo e tornando as enzimas novamente ativas. A enzima responsável pela redução do ácido sulfinico foi denominada de sulfirredoxina (BITEAU *et al.*, 2003), membro de uma família de enzimas antioxidantes encontradas em eucariotos (FINDLEY *et al.*, 2005).

Os seis tipos de Prx possuem padrões de distribuição diferente no encéfalo e são encontradas em diferentes tipos e estruturas celulares. As isoformas das Prx podem ser induzidas no encéfalo em situações de danos, sugerindo função neuroprotetora. Além disso, foram identificados níveis reduzidos de Prx no cerebelo de pessoas com idade avançada, o que poderia contribuir para o estresse oxidativo no envelhecimento (FLOHÉ e HARRIS, 2007).

A Prx-VI se expressa no encéfalo principalmente nos astrócitos, com níveis muito baixos nos neurônios. Níveis altos de Prx-VI foram encontrados em células gliais após

estresse citotóxico e hemorragia. Por outro lado, níveis mais baixos da enzima aparecem em áreas do encéfalo afetadas pela síndrome de Down e nas doenças de Alzheimer e Parkinson (POWER *et al.*, 2008).

Foram encontrados níveis elevados de Prx-I vascular na encefalomielite experimental, indicando que sob condições inflamatórias a camada endotelial é capaz de regular a expressão de Prx-I, que pode funcionar como um mecanismo de defesa endógeno. A indução de Prx-I na camada endotelial da barreira hematoencefálica melhorou sua integridade, reduziu a adesão de monócitos e sua migração para a camada endotelial do encéfalo (SCHREIBELT *et al.*, 2008).

Mizusawa e colaboradores (2000) encontraram grande quantidade de Prx-I no sistema nervoso de rato, principalmente em células de suporte, como oligodendrócito e células de Schwann. Para os autores, a enzima pode ter função importante na proteção contra estresse oxidativo no sistema nervoso. A Prx-II tem sido encontrada em grande quantidade em células onde há alta taxa de utilização do oxigênio. No sistema nervoso, células mais vulneráveis à isquemia, como as regiões CA1 do hipocampo e as células de Purkinje, possuem grande quantidade de Prx-II (SARAFIAN *et al.*, 1999).

1.7. Peróxido de hidrogênio

Entre os diversos peróxidos produzidos pelo organismo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é quantitativamente o mais importante. O encéfalo é capaz de produzi-lo em grande quantidade – 100 μM em condições experimentais (DRINGEN *et al.*, 2005). A formação do radical superóxido requer a adição de um elétron ao oxigênio diatômico, enquanto que a adição de dois elétrons produz o peróxido de hidrogênio. A reação de dismutação do superóxido realizada pela SOD forma o peróxido de hidrogênio (WINYARD *et al.*, 2005; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).



Um dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio é a formação do radical hidroxila (OH^\bullet) por reações catalisadas por ferro e outros metais de transição, como mostra a reação de Fenton (MAIER e CHAN, 2002).



O radical OH^\bullet é muito reativo e pode oxidar rapidamente diversos compostos orgânicos próximos aos locais onde foi produzido. Sua ação tóxica está relacionada principalmente a alterações irreversíveis produzidas em proteínas e ácidos nucleicos. Os ácidos graxos poliinsaturados são componentes essenciais e ocorrem em grandes quantidades nas membranas celulares, garantindo sua fluidez, flexibilidade e permeabilidade seletiva (CATALÁ, 2006). No entanto sua presença torna as membranas mais vulneráveis à peroxidação iniciada pelo OH^\bullet , levando à destruição das membranas e a produção de resíduos tóxicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE), substância mutagênicas e carcinogênicas para mamíferos (CHONG *et al.*, 2005; NIKI, 2009).

Além da SOD, diversas enzimas contribuem para a formação do peróxido de hidrogênio, entre as quais glicose oxidase, monoamina oxidase, xantina oxidase, NO sintase e o citocromo P450. A produção de peróxido e hidrogênio também pode ocorrer por meio da estimulação de diversos receptores, como mostra a figura 7 (RHEE *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2007; SHUVAEVA, *et al.*, 2009).

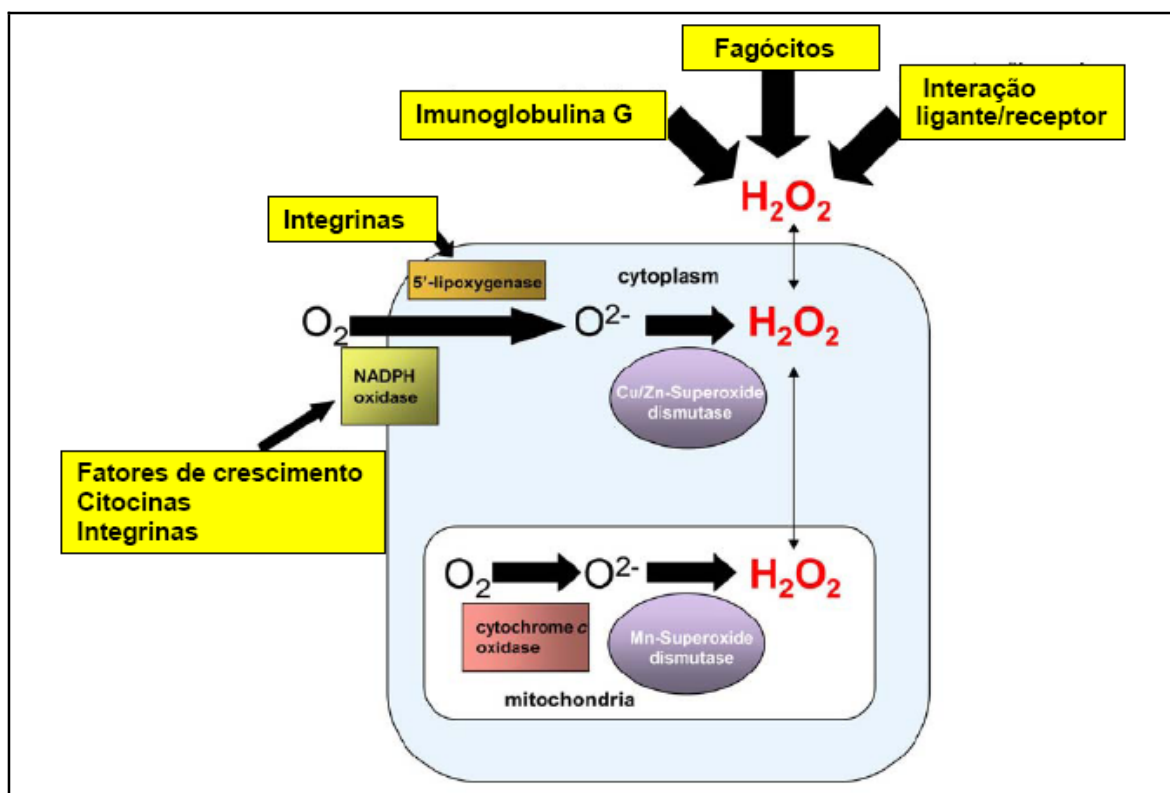


Figura 7. Produção de peróxido de hidrogênio em células eucarióticas. O peróxido de hidrogênio pode ser produzido extracelularmente por imunoglobulinas G, pela interação de ligantes e seus receptores e por células imunes fagocíticas. Radicais superóxido, que são produzidos pela redução parcial do oxigênio pela citocromo c oxidase na mitocôndria, por NADPH oxidase associado às membranas ou pela 5'-lipooxygenase no citoplasma, são convertidos rapidamente em peróxido de hidrogênio pelas superóxido dismutase (SOD) mitocondrial e citoplasmática. Fatores de crescimento, citocinas e integrinas estimulam a ativação da NADPH oxidase e 5'-lipooxygenase, formando o radical superóxido, que são também transformados em peróxido de hidrogênio pela SOD. O peróxido de hidrogênio pode difundir facilmente através das membranas e atingir diversos locais na célula (Retirado de Veal, *et al.*, 2007).

1.7.1. Peróxido de hidrogênio e sinalização celular

A transdução de sinais permite que as células percebam mudanças que ocorrem em seu ambiente e reajam, convertendo os estímulos externos em respostas fisiológicas adequadas (SOYER *et al.*, 2006). Essas mudanças podem ser físicas, como alterações na intensidade da luz, temperatura, pressão ou carga elétrica, ou alterações químicas, como liberação de hormônios e neurotransmissores (SCHENK e SNAAR-JAGALSKA, 1999).

A maioria das vias de sinalização celular envolve a fosforilação de proteínas, sistema que regula muitas vias metabólicas em eucariotos. É um processo reversível e dinâmico em que proteínas alvos são fosforiladas em seus resíduos de serina, treonina ou tirosina por uma

ou mais proteína cinase e posteriormente esses grupos são removidos por proteínas fosfatases específicas (MONTEIRO e STERN, 1996)

A fosforilação de uma proteína pode criar novos modelos de reconhecimento para interações entre proteínas, seu controle de estabilidade e regulação da atividade enzimática. Contudo, alterações na atividade dessas proteínas contribuem para a patogênese de diversas doenças humanas (ZHANG *et al.*, 2002). Da mesma forma, mutações e efeitos de toxinas e patógenos em proteínas cinases e fosfatases específicas podem provocar diversas desordens dentro da célula (COHEN, 2001).

O H_2O_2 é uma molécula pequena e de fácil difusão encontrada em praticamente todo o organismo e que pode ser produzida e eliminada rapidamente. É reconhecido como mensageiro intracelular quando encontrado em condições que não sejam tóxicas. Controla processos biológicos, afetando as funções de diversas proteínas, incluindo as cinases, fosfatases, além de fatores de transcrição, fosfolipases, canais iônicos e proteínas G (RHEE, *et al.*, 2003).

Como molécula mensageira, pequenas concentrações de H_2O_2 podem iniciar cascatas de sinalização associadas ao metabolismo e à proliferação. Utilizando células-tronco embrionárias de camundongos, LI e colaboradores (2006) observaram que concentrações nanomolares de H_2O_2 conduziram os estágios iniciais de cardiogênese. A supressão da NOX-4, uma família de NADPH oxidase encontrada nesses roedores que regula a produção de peróxido de hidrogênio, comprometeu a miofibrinogênese.

A família das proteínas tirosina cinases Src (SFKs) possui função importante no controle da proliferação, diferenciação, sobrevivência, adesão e rearranjo do citoesqueleto e é especializada na sinalização celular por meio de um conjunto diversificado de receptores de superfície celular, tais como receptores de fatores de crescimento, antígenos acoplados a proteínas G, receptores de citocinas e integrinas. Estudos realizados com células endoteliais demonstraram que concentrações baixas e moderadas de H_2O_2 (50 μ M - 250 μ M) inibiram as

proteínas SKF temporariamente, tornando as células endoteliais resistentes aos fatores de crescimento e citocinas, protegendo-as da ativação inflamatória (TANG *et al.*, 2005).

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) atuam na transdução de sinais entre a superfície de membrana e o núcleo e regulam a morte e sobrevivência celular (NOZAKI *et al.*, 2001). Modelo *in vitro* da barreira hematoencefálica, consistindo de células microvasculares endoteliais do encéfalo, demonstrou que o peróxido de hidrogênio é o principal mediador nos mecanismos envolvidos nas alterações da permeabilidade celular durante a reoxigenação pós-hipóxia. Ele ativa fosfolipases C por meio de receptores acoplados à proteína G, aumentando a concentração de Ca^{2+} intracelular e levando à ativação de MAPKs p42/p44. Essas alterações provocam modificações das proteínas TJ (junção oclusiva), que regulam as mudanças na permeabilidade celular ao longo da barreira hematoencefálica. Dessa forma, pode ser o principal causador de danos que ocorrem durante a reperfusão na isquemia cerebral (FISCHER *et al.*, 2005).

Foley e colaboradores (2004), ao examinarem frações microsossomais de cérebro de ratos, constataram que a atividade das MAPKs é regulada principalmente, ou inteiramente, pelas PP2A (proteínas fosfatases 2A). Eles observaram que o peróxido de hidrogênio (na presença e ausência de glutatona reduzida) e a glutatona oxidada inibiram a atividade das MAPKs, situação que foi revertida com a utilização do agente redutor DDT (ditiotreitól). Para os autores, a inibição de atividade das PP2A pode ser um importante fator no aumento da fosforilação de MAPKs no cérebro em resposta ao estresse oxidativo em diversas situações, como as encontradas em doenças neurodegenerativas.

O que se observa é que o H_2O_2 pode atuar de maneira positiva ou negativa na regulação de diversas vias de sinalização, dependendo dos níveis de peróxido utilizado e dos tipos celulares avaliados. Níveis elevados de H_2O_2 podem induzir estresse oxidativo e causar danos celulares normalmente associados a início e à progressão de diversas patologias, entre as quais doenças neurodegenerativas, diabetes, aterosclerose e câncer (VEAL *et al.*, 2007).

1.8. Peróxido de cumeno.

O peróxido de cumeno (CuOOH) é um peróxido orgânico relativamente estável (ZHU *et al.*, 2010). O CuOOH tem sido utilizado em pesquisas para induzir estresse oxidativo e também no estudo de danos causados por peróxidos orgânicos. Isso porque, no sistema nervoso, substâncias como leucotrienos e prostaglandinas, derivadas enzimaticamente de ácidos graxos, estão relacionadas à inflamação e esse fenômeno pode ser acompanhado de lipoperoxidação. A lipoperoxidação tem sido relacionada a diversas doenças neurodegenerativas (DRINGEN *et al.*, 2005).

Em trabalho realizado com ratos por YAO e colaboradores (1993), o CuOOH inibiu a enzima P-450, presente na cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria. Essa enzima é relevante no metabolismo de oxidação e redução de diversos endobióticos e xenobióticos.

1.9. Fatias de hipocampo

O estresse oxidativo tem sido observado em diversas doenças neurodegenerativas e o hipocampo é uma região do encéfalo suscetível a esses danos (MAIER e CHAN, 2002). A neurodegeneração no hipocampo tem sido associada à diminuição da memória e da aprendizagem em camundongos (LIU *et al.*, 2003) e ratos (TALPOS *et al.*, 2008). O estresse relacionado à depressão pode causar neurodegeneração no hipocampo, como demonstrado em vários modelos animais (NESTLER *et al.*, 2002) e em humanos (SCORZA *et al.*, 2005).

A utilização de antioxidantes tem sido promissora em diversas patologias envolvendo o estresse oxidativo. Estudos realizados em ratos com idade avançada demonstraram que a vitamina E aliada a exercício físico reduziu a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas no córtex e hipocampo de ratos (JOLITHA *et al.*, 2006) e protegeu o hipocampo e o cerebelo de ratos em desenvolvimento contra danos oxidativos induzidos por etanol (SHIPOOR, *et al.*, 2009). Drogas que mimetizam a SOD e a catalase recuperaram a memória e o déficit na

aprendizagem e reduziram o estresse oxidativo no hipocampo de camundongos com idade avançada (LIU *et al.*, 2003).

Fatias de tecidos de regiões do encéfalo mantidas em meio fisiológico *in vitro* possuem muitas vantagens na experimentação neurobiológica, incluindo acesso visual e físico para estimulação e gravação de eletrodos e na utilização de modelos de avaliação de substâncias neuroativas. A utilização de fatias de hipocampo permite aumentar, diminuir ou bloquear a expressão de proteínas específicas em um ambiente controlado, ao mesmo tempo em que diversas conexões celulares são preservadas (XIAO e WANG, 1998).

A utilização de fatias de hipocampo *in vitro* tem sido utilizada em diversos estudos de mecanismos celulares e moleculares, tais como os relacionados à potenciação de longo termo e estudo de neurotransmissores (TEYLER, 1999), toxicidade e vias de transdução de sinais (LEAL *et al.*, 1997; CORDOVA *et al.*, 2004) e fatores de transcrição (BUTLER *et al.*, 2002), como também na avaliação do estresse oxidativo e de efeitos neuroprotetores de drogas que atuam nas vias de sinalização e morte celular (REKLING, 2003; LIANG *et al.*, 2005; BAHL, 2007; MOLZ *et al.*, 2008). Feeney e colaboradores (2008) utilizaram com sucesso fatias organotípicas de hipocampo para avaliar a atuação de antioxidantes como o α -tocoferol e glutathione em danos provocados por peróxido de hidrogênio.

1.10. Linhagens de células de glioma de rato (C6).

As células C6 são originárias de glioma de rato (*Rattus norvegicus*). Foram clonadas por Benda e colaboradores (1968) após diversas tentativas de obter crescimento celular em tumores induzidos pelo agente cancerígeno N-nitrosometilurea.

As células C6 possuem morfologia de fibroblastos e possuem muitas características dos astrócitos, entre elas, receptores para glicocorticóides e expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) relacionada ao movimento, comunicação celular e funcionamento da barreira celular hematoencefálica (LUNG *et al.*, 2005; ROHN e MOUSER, 2005).

Em função dessas características, as células C6 têm sido utilizadas em diversas pesquisas, entre as quais em situações que envolve estresse oxidativo. O efeito de peróxidos de hidrogênio e orgânicos tem sido avaliado nessas células em diversos trabalhos (ZIELINSKA *et al.*, 2003; QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2007; LINDEN *et al.*, 2008).

Ray e colaboradores (1999) observaram o aumento da expressão da Calpaína, uma cisteino-protease, em células C6 submetidas ao peróxido de hidrogênio. Essa enzima tem sua expressão aumentada em situações neuropatológicas, incluindo Alzheimer e Parkinson. Além disso, estudos com essas células permitiram demonstrar o envolvimento de células gliais na produção do peptídeo β -amiloide, relacionado ao mal de Alzheimer (MORATO e MAYOR, 1993).

1.11. Linhagem de células de neuroblastoma de camundongos (N2a).

As células N2a foram clonadas a partir de uma linhagem de tumor de camundongos albinos (*Mus musculus*) (KLEBE e RUDDLE, 1969). Olmsdted e colaboradores (1970), ao utilizarem vimblastina, substância que inibe a formação do fuso mitótico e interrompe a divisão celular em mitose, encontraram grande quantidade de microtúbulos nessas células. Os neurofilamentos são abundantes nos neurônios. São sintetizados no corpo celular e transportados pelo transporte axonal lento. Há evidências de sua acumulação em diversas doenças neurodegenerativas (MILLER *et al.*, 2002).

Estudos realizados com células N2a (ZHOU *et al.*, 2010) sugerem que a proteína cinase dependente de ciclina-5 (Cdk5) exerce função importante na modificação da estrutura neuronal. O aumento de sua atividade pode elevar os níveis de fosforilação de neurofilamentos e da proteína tau, que estabiliza os microtúbulos e, portanto, desestabilizar o transporte axonal. Situações como essas são encontradas em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e demência fronto-temporal.

Em trabalho realizado com células N2a, Bronisz e colaboradores (2002) avaliaram os mecanismos apoptóticos das proteínas cinase c (PKC) e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-cinase), enzimas envolvidas no crescimento, proliferação e diferenciação celular. Ao utilizarem inibidores para essas enzimas, eles demonstraram que suas atividades são essenciais, principalmente na supressão apoptótica neuronal, imprópria durante o desenvolvimento e em diversos processos patológicos do sistema nervoso.

As células N2a tem sido objeto de estudo para avaliação de antioxidantes, como o magiferin, substância extraída da manga (*Mangifera indica*), que protegeu essas células contra a toxicidade do MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), substância que induz síndrome parkinsoniana em humanos e em outros animais (AMAZZAL *et al.*, 2007). Em modelo experimental de células N2a infectadas com o vírus da encefalite japonesa (JEV), a minociclina, antibiótico do grupo das tetraciclina, reduziu os danos neuronais em parte pela inibição do estresse oxidativo (MISHRA *et al.*, 2009).

2. Justificativa

A produção de oxidantes pelo organismo é constante, da mesma forma que é constante a sua eliminação pelas enzimas que realizam esse trabalho. Essas duas forças opostas mantêm em equilíbrio a concentração de substâncias que de alguma forma podem causar danos aos lipídios de membrana, proteínas e também ao DNA. Essa situação é particularmente importante no sistema nervoso, mais suscetível aos danos causados pelo estresse oxidativo (HALLIWELL, 1992).

Os neurônios possuem baixas concentrações de catalase, superóxido dismutase, glutathione, tocoferol, transferrina e ceruloplasmina, que são substâncias envolvidas na proteção contra danos oxidativos. Além disso, neurotransmissores como a dopamina, glutamato e NO também representam uma fonte de produção de radicais de oxigênio (GOSSLAU e RENSING, 2000).

Concentrações elevadas de ácidos graxos poliinsaturados, níveis elevados de ferro e a tendência em acumular outros metais, aumentam as chances de peroxidação lipídica no cérebro. Os danos oxidativos induzidos pela atividade de proteínas-alvo que interagem com radicais livres e íons metálicos são indicativos de muitas doenças neurodegenerativas (GAETA e HIDER, 2005).

Apesar das baixas concentrações, a CAT possui ampla distribuição em células do sistema nervoso central. Está presente em maior quantidade nos oligodendrócitos e astrócitos, e em concentrações menores nos neurônios (SOKOLOVA *et al.*, 2001; HIRRLINGER *et al.*, 2002). Baud e colaboradores (2004) demonstraram a cooperação entre CAT e GPx na eliminação de peróxido de hidrogênio em culturas de oligodendrócitos.

Nas fases iniciais de isquemia induzida em ratos, foi observada diminuição da atividade da CAT no hipocampo e estriado. A baixa atividade da enzima nessas situações poderia estar relacionada à alta suscetibilidade dessas duas estruturas ao estresse oxidativo decorrente da isquemia/reperfusão (HOMI *et al.*, 2002).

Nos estados epiléticos induzidos pela pilocarpina em ratos, Freitas e colaboradores (2004) encontraram aumento da atividade da CAT no hipocampo, estriado e córtex frontal. Para os autores, a alta atividade da CAT nessas regiões poderia ser um mecanismo compensatório para evitar o aumento do estresse.

O sistema antioxidante da glutathione tem sido considerado, juntamente com o sistema da tiorredoxina, como dois mecanismos essenciais para manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação de agentes oxidantes na célula (DRINGEN *et al.*, 2005; ARNÉR, 2009). A peroxirredoxina, mais recentemente, têm sido apontadas como enzima importantes na redução de peróxidos e peroxinitritos (RHE *et al.*, 2005)

Pesquisas feitas com a GR, que atua no restabelecimento dos níveis da forma reduzida da glutathione (GSH) no organismo, demonstraram que sua inibição desequilibra o estado redox nas células (TRETTER *et al.*, 2003). Por outro lado, em pesquisas feitas com linhagens de células PC12 resistentes a beta amiloide, peptídeo relacionado ao mal de Alzheimer, Cumming e colaboradores (2007) encontraram expressões de múltiplas isoformas de Prx. Essas células também exibiam níveis elevados de tiorredoxina e tiorredoxina redutase, duas proteínas importantes na manutenção da atividade da Prx. Para os autores, esses dados sugerem que o aumento da atividade da Prx é uma resposta ao estresse oxidativo iniciado pela exposição ao beta amiloide.

Nesse sentido, o entendimento dos mecanismos de defesas antioxidantes da catalase e dos sistemas da glutathione, tiorredoxina e peroxirredoxina merece especial atenção.

3. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar o envolvimento da catalase, glutational peroxidase e da peroxirredoxina na defesa contra danos oxidativos em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a submetidas a tratamentos com peróxidos de hidrogênio e de cumeno.

2.2. Objetivos específicos

1) Avaliar os efeitos dos inibidores da glutational redutase (BCNU), da tiorredoxina redutase (CDNB), e o da catalase (AT, aminotriazol) em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio e de cumeno, relacionados aos seguintes parâmetros:

- a) degradação de peróxidos;
- b) viabilidade celular;
- c) permeabilidade celular;
- d) danos ao DNA.

2) Investigar se a enzima Prx-II tem suas formas reduzida, oxidada e super-oxidada (SO_3) alteradas pelos tratamentos descritos anteriormente, através da imunodeteção destas isoformas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Reagentes e materiais

Tripsina, soro fetal bovino, agarose de baixo ponto de fusão (*Low-melting point*) da *Gibco BRL, New York, USA*; DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) da *Invitrogen Corporation, Auckland, New Zeland*; ácido tetracético etileno diamino (EDTA), cloreto de sódio, cloreto de potássio, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico (HEPES), glicose, cloreto de cálcio, azul de *Trypan*, bicarbonato de sódio, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida (NADPH), ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico (DTNB), peróxido de cumeno (CuOOH), Triton-X 100, xilenol *Orange*, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), agarose, trishidroxiaminometano, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, nitrato de amônio, nitrato de prata, ácido tungstosílico, azul de bromofenol, gel de acrilamina, 3-(3-*Cholamidopropyl*)dimethylammonio)-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), luminol, glutathiona oxidada (GSSG), catalase, glicerol, dodecil sulfato de sódio (SDS), glicina) Tween 20, β -actina (*Monoclonal Anti- β -Actin peroxidase mouse - A-3854*), inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail -P2714*), iodeto de propídio (IP), glutathiona redutase (GR), NEM (N-Etilmaleimida), da *Sigma (St. Louis, MO, USA)*; membranas de nitrocelulose, da *Bio Rad, Berkeley, USA*; AT (aminotriazol), da *Chem Service Pennsylvania, USA*; BCNU {1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosuréia}, da *BMS, New Jersey, USA*; anticorpo secundário (*Goat pAb to Rbt IgG, Ab 6721*), anticorpo primário para a peroxirredoxina-II (*Rb phb to Peroxiredoxin 2 Ab16820-100*), anticorpo para a peroxirredoxina-SO₃ (*Rabbit polyclonal to peroxiredoxin-SO₃ -Ab 16830*), da *Abcam (Cambridge, MA, USA)*; filme de alta performance ECL, marcador de peso molecular (*Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers ,12 000 – 225 000 kDa*), da *Ge Healthcare (New Jersey, USA)*; reveladores para filmes, fixadores para filmes, da *Kodak (New York, USA)*; metanol, da *Reagen (Paraná, Brasil)*; formaldeído, ácido acético, ácido clorídrico, dimetil-sufóxido (DMSO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido perclórico (PCA), sulfato ferroso amoniacal e etanol, da *Merck (Darmstadt, Germany)*.

4.2. Equipamentos

Fatiador de tecidos (*McIlwain, Redding, USA*), Cuba para eletroforese horizontal (*Dige, São Paulo, Brasil*), banho-maria (*Fanem*), espectrofotômetro (*Cary 50, Varian Inc., Palo Alto, USA*), centrífuga refrigerada (*Eppendorf modelo 5804R, Hamburg, Germany*), cubas (*mini-protean tetra cell e mini trans-blot cell, Bio-Rad, Berkeley, USA*), fonte de eletroforese (*Power Pac HC Bio-Rad, Berkeley, USA*), balança (*Bel Engineering, Monza, Italy*), Agitador (*Dist DIK 200, Florianópolis, Brasil*), leitor de fluorescência (*TECAN, modelo Infinite M200, Männedorf, Switzerland*), câmara de Neubauer (*Laboroptik, Friedrichsdorf, Germany*), microscópio (*Zeiss, Deutschland, Germany*).

4.3. Animais

Para obtenção das fatias de hipocampo, foram utilizados ratos machos adultos com idade entre 60 e 90 dias, da linhagem *Wistar*, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no biotério setorial do Centro de Ciências Fisiológicas da UFSC com temperatura entre 23° e 25° C, com ciclo de claro-escuro de 12 horas e água e alimento *ad libitum*. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA - PP096 – 09/05/2007).

4.4. Fatias de hipocampo de ratos

As fatias de hipocampo foram preparadas como descrito por Leal *et al.*, (1997). Foi utilizado o meio hepes-salina, contendo 124 mM de NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM de Hepes pH 7.4, 12 mM de glicose e 1 mM de CaCl₂, oxigenado por 30 minutos antes da utilização. Os animais foram decapitados com guilhotina e o encéfalo retirado rapidamente. Todos os procedimentos de dissecação foram feitos em ambiente com temperatura em torno de 4° C.

Os hipocampos foram retirados com o auxílio de pincéis finos, utilizando uma placa de *Petri* invertida, coberta com papel filtro umedecido com hepes-salina. Em seguida, foram feitos cortes transversais de 0,4 mm de espessura com fatiador McIlwain. Os hipocampos fatiados foram colocados em placa de *Petri* com meio HEPES-salina a 4° C, sobre fundo escuro, para facilitar sua separação, feita com pincéis. Aquelas fatias com tamanhos similares foram utilizadas individualmente nos diversos procedimentos. Antes de cada experimento, as fatias foram pré-incubadas por 30 minutos em tubos ependorfes de 02 mL de fundo côncavo com 500 µL de solução e em banho-maria a 37° C para garantir sua recuperação. Após esse período, foram iniciados os procedimentos experimentais, feitos em triplicata, utilizando 200 µL de solução.

4.5. Culturas celulares

Foram utilizadas Células de glioma de ratos C6 (*Rattus norvegicus*), obtidas da variedade *Wistar*, e células de neuroblastoma obtidas de camundongos albinos N2a (*Mus musculus*) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia Experimental da UFSC (LAFEX).

Para conservação, as células foram mantidas em nitrogênio líquido na quantidade de 03×10^6 células por criotubo antes da utilização. Os criotubos foram descongelados em banho-maria a 37° C e as células retiradas com auxílio de pipeta de vidro estéril, colocadas em tubo falcon com meio de cultura, homogeneizadas delicadamente e depois centrifugadas por 6 minutos a 300 g. O sobrenadante foi desprezado e o concentrado foi ressuspensão com novo meio de cultura. O conteúdo do tubo falcon foi transferido para uma garrafa de cultura, completado até 03 mL e levado para a estufa.

Depois do descongelamento, as células foram mantidas em meio de cultura D-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mM), glicose (4,5 g/L),

bicarbonato de sódio (1,5 g/L), penicilina (0,5U/ml), estreptomicina (0,5 mg/ml) e incubada à 37°C e atmosfera umidificada em 95 % contendo 5% CO₂.

Para os experimentos, as células C6 e N2a foram semeadas nas concentrações de 2×10^5 células/mL em placas de 24 poços, no volume de 500 µL. A exceção foi para os experimentos com *Western Blot*, em que foram semeadas na concentração de 10^6 células/mL em garrafas, no volume de 5 mL, ambas com meio de cultura D-MEM, 24 horas antes dos procedimentos.

Antes de iniciar os tratamentos com as células C6 e N2a, o meio de incubação D-MEM foi substituído pelo meio hepes-salina, no qual foram realizados todos os procedimentos.

4.6. Tratamentos

Inicialmente foram avaliados os efeitos dos inibidores das enzimas antioxidantes nas fatias de hipocampo de rato. Foram utilizados o BCNU, inibidor da glutathione redutase (WALTHER *et al.*, 2003), CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), inibidor da tioredoxina redutase (ARNÉR, *et al.*, 1995) e AMT (aminotriazol), inibidor da catalase (HERMANN *et al.*, 1997).

4.6.1. Fatias de hipocampo de ratos

As fatias de hipocampo foram pré-tratadas por 30 minutos com 200 e 500 µM de BCNU, 25 e 50 µM de CDNB ou a combinação de BCNU + CDNB. Após a pré-incubação, as células foram expostas ao H₂O₂ nas concentrações de 100, 300, 1000 e 3000 µM, durante 60 minutos. Nos tratamentos com CuOOH, a concentração foi de 100 µM e o tempo de incubação foi de 90 minutos. O esquema dos tratamentos está apresentado na Tabela 1.

4.6.2. Células C6 e N2a

As linhagens de células C6 foram pré-tratadas BCNU 100 μ M e CDNB 25 μ M e em seguida foram incubadas com H₂O₂ 100 μ M durante 60 minutos. Na linhagem N2a, os tratamentos e os tempos de pré-incubação e incubação foram iguais, com exceção para o CDNB, o qual foi adicionado a essas células na concentração de 10 μ M (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo dos tratamentos com inibidores e peróxidos.

Grupos	Pré-incubação – 30'	Incubação – 60'ou 90'
CTL	Hepes-salina	Hepes-salina
VEÍCULO (Hepes-salina + Etanol)	Veículo	Hepes-salina
AT	AT	Hepes-salina
BCNU	BCNU	Hepes-salina
CDNB	CDNB	Hepes-salina
BCNU+CDNB	BCNU+CDNB	Hepes-salina
PERÓXIDOS	Veículo	H ₂ O ₂ ou CuOOH
AT + PERÓXIDOS	AT	H ₂ O ₂ ou CuOOH
BCNU + PERÓXIDOS	BCNU	H ₂ O ₂ ou CuOOH
CDNB + PERÓXIDOS	CDNB	H ₂ O ₂ ou CuOOH
BCNU + CDNB + PERÓXIDOS	BCNU + CDNB	H ₂ O ₂ ou CuOOH

4.7. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, GR e TrxR em fatias de hipocampo de ratos após pré-incubação com inibidores

Para avaliar os efeitos dos inibidores nas enzimas glutathione redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR) e catalase (CAT) as fatias de hipocampo foram preparadas como descrito anteriormente e tratadas com BCNU 200 μ M ou 500 μ M, CDNB 25 μ M ou 50 μ M, e AT 50 mM durante 30 minutos. Após os tratamentos, as fatias foram homogeneizadas em 300 μ L de tampão hepes 20 mM, pH 7,0 e depois centrifugadas a 20.000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das enzimas. Foram utilizadas 12 fatias para cada grupo, com o objetivo de se obter níveis de atividade enzimática mensuráveis.

4.7.1. Glutathiona redutase (GR)

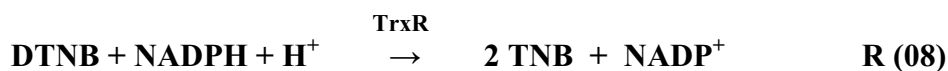
A GR foi determinada por meio do consumo de NADPH durante a redução da glutathiona oxidada (GSSG) para reduzida (GSH), como descrito por Carlberg e Mannervik, (1985). A taxa de oxidação do NADPH, que em condições de saturação, representa a atividade enzimática, é observada a 340 nm em leitura feita em espectrofotômetro em meio contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM e NADPH 0,2 mM, a 37° C.



Os valores foram obtidos em nmol/min/mg de proteína, equivalente a miliunidades (Um). Os dados estão representados pelo percentual de atividade da enzima em relação ao grupo controle.

4.7.2. Tiorredoxina redutase (TrxR)

A TrxR foi determinada pelo método descrito por Arnér e colaboradores (1999), em que o DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico), ou reagente de Ellman, é utilizado como substrato na reação. O TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico), de cor amarela, possui absorbância máxima em 412 nm, e é resultado da reação catalisada pela TrxR, onde há consumo de NADPH.



A amostra foi adicionada ao meio contendo tampão fosfato 100 mM pH 7,0, EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e 0,2 mg/mL de BSA (soro albumina bovina) e foi feita leitura inicial de 08 a 10 minutos no espectrofotômetro a 412 nm, a 37° C, até a estabilização do crescimento da curva basal. Em seguida, foi adicionado NADPH 200 µM. A atividade da TrxR foi determinada pelo aumento da absorbância após a adição de NADPH. Os dados estão representados pelo percentual de atividade da enzima em relação ao grupo controle.

4.7.3. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada como descrito por Aebi (1984), em que se mede o desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima presente no meio de reação, o qual contém 10 mM de H₂O₂, tampão fosfato 50 mM pH 7,0, EDTA 0,5 mM e 0,012 %Triton X100.



A leitura foi feita em 240 nm durante 3 minutos. Os dados estão representados pelo percentual de atividade da enzima em relação ao grupo controle.

4.8. Curvas de consumo de peróxidos – PCA-FOX

O consumo de peróxidos das fatias de hipocampo e das culturas celulares foi avaliado pelo método PCA-FOX, como descrito por Gay e Gerbicki, (2002). O princípio do método baseia-se na oxidação do Ferro II (Fe²⁺) a Ferro III (Fe³⁺) e sua subsequente reação com o xilenol *orange*, formando a cor laranja. O meio PCA-FOX consiste de ácido perclórico (PCA) 110 mM, sulfato ferroso amoniacal 0,25 mM e xilenol *orange* 0,25 mM.

De 5 a 50 µL do meio de incubação, dependendo da concentração de peróxidos, foi adicionado a um microtubo contendo o meio de reação PCA-FOX. Após 30 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em 560 nm. A quantificação dos níveis de peróxidos foi determinada a partir da comparação entre os resultados obtidos e uma curva padrão feita de concentrações conhecidas de peróxido de cumeno ou de hidrogênio.

4.8.1. Consumo de peróxidos

Para avaliar o efeito dos inibidores das enzimas antioxidantes sobre o consumo de peróxidos, as fatias de hipocampo e as células C6 e N2a foram preparadas como descrito previamente. As fatias de hipocampo ou células foram pré-incubadas por 30 minutos no meio hepes-salina, veículo ou inibidores, conforme indicado na legenda das figuras. Em seguida

foram incubadas durante 60 minutos com peróxido de hidrogênio ou 90 minutos com peróxido de cumeno. As curvas de consumo de peróxidos foram feitas a partir de alíquotas retiradas do meio de incubação nos tempos indicados.

4.9. Avaliação da viabilidade celular, pela redução do MTT

A viabilidade celular das fatias de hipocampo e das linhagens celulares C6 e N2a foi determinada com a utilização do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], que ao ser transformado por enzimas mitocondriais, forma o composto formazam, de cor púrpura. A função mitocondrial, e dessa forma a viabilidade celular, está relacionada à capacidade dessa organela em reduzir o MTT e formar cristais do cromógeno (LEEMAN *et al.*, 1995).

Após tratamentos com os inibidores das enzimas antioxidantes e peróxidos, as fatias de hipocampo, as células C6 ou N2a foram incubadas por um período de 30 minutos em banho-maria a 37 °C com o meio hepes-salina contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após esse período, o formazam incorporado às fatias e às células foi extraído por 1 hora com a utilização de dimetil-sufóxido (DMSO), em agitação constante. A capacidade redutora mitocondrial foi determinada pela leitura da absorbância das amostras, lidas em espectrofotômetro a 550 nm e os resultados foram expressos em relação à porcentagem do controle.

4.10. Avaliação da permeabilidade das membranas, pela incorporação do IP

A permeabilidade celular foi avaliada pelo método baseado na incorporação do iodeto de propídio (IP) um composto polar que penetra somente em células mortas ou com membranas danificadas. Ao ser incorporado pelas células, ele se combina com o DNA e produz fluorescência vermelha (630 nm) ao ser excitado por luz verde (495 nm), que pode ser lida em leitor de fluorescência (SANO *et al.*, 1995; OSUCHOWSKI e SHARMA, 2005; HIGUCHI *et al.*, 2007; GREEN *et al.*, 2007; FIGUEIREDO, 2009).

Para avaliação da permeabilidade celular pela incorporação do IP, as fatias de hipocampo ou as células C6 e N2a foram preparadas como descrito anteriormente e tratadas em placa de 24 poços (células) e 96 poços (fatias) para posterior avaliação em leitor de fluorescência. As fatias e as células foram pré-incubadas durante 30 minutos no meio hepes-salina, veículo ou inibidores e, posteriormente, incubadas com peróxido de hidrogênio ou com peróxido de cumeno nos tempos e concentrações indicados.

Após tratamentos com os inibidores das enzimas antioxidantes e peróxidos, as fatias de hipocampo e as células C6 e N2a foram incubadas por 30 minutos em banho-maria a 37 °C com 7 µg/ml de IP. Após esse período, a fluorescência foi lida em leitor de placa com excitação em 535 nm e emissão em 617 nm. Nas fatias, cada poço da placa foi subdividido em três regiões, nos quais foram feitas 5 leituras sucessivas. Nas células, cada poço da placa foi subdividido em 5 regiões, nas quais foram feitas 3 leituras sucessivas. Os valores médios foram obtidos em unidades arbitrárias de fluorescência e apresentados em relação à porcentagem do controle.

4.11. Avaliação de danos ao DNA, pelo ensaio do cometa-

O ensaio do cometa, que avalia os danos ao DNA e e sítios álcali-lábeis em células individuais (HELMA e UHL, 2000), foi realizado como descrito por Singh e colaboradores (1988) com algumas modificações. A coloração foi feita com solução de prata, de acordo com Nadin *et al* (2001). O teste do cometa foi realizado imediatamente após o s tratamentos.

Uma fatia de hipocampo foi adicionada a um microtubo contendo 100 µL de PBS, 20 mM de EDTA e 10 % de DMSO, pH 7,4 e triturada manualmente e suavemente por 10 segundos com o auxílio de um bastão homogeneizador até se obter uma suspensão de células. Foi retirada alíquota de 20 µL da fração superior da suspensão, que foi adicionada a 180 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,75 % (*Low-melting point*) preparada com solução salina pH 7,4. A mistura foi aplicada à lâmina de microscópio previamente preparadas com

uma camada de agarose 1,5 %, diluída em solução salina-fosfato, e depois cobertas com lamínulas, em duplicata.

Em seguida aos tratamentos das linhagens celulares, o meio de hepes-salina foi substituído por tripsina 0,05 %, no volume de 400 μ L por poço para liberação das células. Após dois minutos de movimentos suaves com pipeta, foi adicionado 500 μ L de meio D-MEM ao poço, com o objetivo de evitar danos às células. O conteúdo de cada poço foi centrifugado a 1.000 g a 37° C por 10 minutos. Em seguida foi retirado parte do sobrenadante, ficando apenas 70 μ L do meio, juntamente com o concentrado contendo as células. A esse volume foi adicionado 300 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,75 %. O material, depois de misturado suavemente com o auxílio de pipeta, foi aplicado a lâminas de microscópio previamente preparadas com agarose e depois coberta com lamínula.

Após a aplicação das amostras, as lâminas foram deixadas para solidificar por 15 minutos a 10 °C e depois colocadas em solução de lise previamente gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, 1 % Triton X100 e 10 % DMSO, em pH 10), por duas horas a 4 °C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em solução alcalina pH ~13 (300 mM NaOH e 1 mM EDTA) em cuba de eletroforese horizontal por 20 minutos e em seguida foi aplicada corrente elétrica de 300 mA e 25 volts por 25 minutos. Depois, as lâminas foram incubadas com tris-base 0,4 M, pH 7,5, para tamponamento, e em seguida lavadas com água destilada e fixadas por 10 minutos em solução contendo 15 % de ácido tricloroacético, 5 % de sulfato de zinco e 5 % de glicerol. Após a fixação, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada e deixadas para secar por 5 horas.

As lâminas foram reidratadas com água destilada durante 05 minutos antes da coloração. Para a visualização, durante esse procedimento, utilizou-se lâmpada com luz vermelha para evitar danos ao DNA. Foram utilizadas 66 % da solução A (5 % de carbonato de sódio) e 34 % da solução B (0,1 % de nitrato de amônio, 0,1 % de nitrato de prata, 0,25 % de ácido tungstosilícico e 15 % de formaldeído) em cada cuba durante o procedimento. A

coloração durou 20 minutos a 37 °C com agitação constante. As cubas contendo as lâminas foram cobertas para proteção contra a luminosidade. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água destilada e mergulhadas em solução de parada (ácido acético a 1 %).

O índice de danos ao DNA foi determinado em microscópio óptico de acordo com o comprimento da migração do DNA, visualizado como uma cauda que parte do DNA circular. Foram analisadas 100 células de cada grupo – 50 para cada duplicata -, nas quais a avaliação dos danos ao DNA obedeceu à seguinte classificação, considerando o tamanho da cauda: classe 0, as células sem cauda, portanto, sem danos; classe 1, células com cauda curta, menor do que o diâmetro da cabeça do cometa; classe 2, cauda medindo de uma a duas vezes o tamanho da cabeça; classe 3, células com cauda maior do que duas vezes o tamanho da cabeça; e classe 4, cometas com cauda longa e núcleo pequeno. A pontuação das amostras para o cálculo do índice de danos foi feita de acordo com a visualização das caudas em cada classe, de acordo com o seguinte cálculo: índice de danos ao DNA = $\{(N \text{ classe } 1 \times 0) + (N \text{ classe } 2 \times 1) + (N \text{ classe } 3 \times 2) + (N \text{ classe } 4 \times 3) + (N \text{ classe } 5 \times 4)\}$ (figura8).

Ao final, foi obtida uma pontuação de cada amostra, com índice de danos variando de 0, quando há ausência de danos, a 400, o dano máximo. Os guias e recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram o escore visual um método válido para avaliação de danos (ROSA *et al.*, 2007).

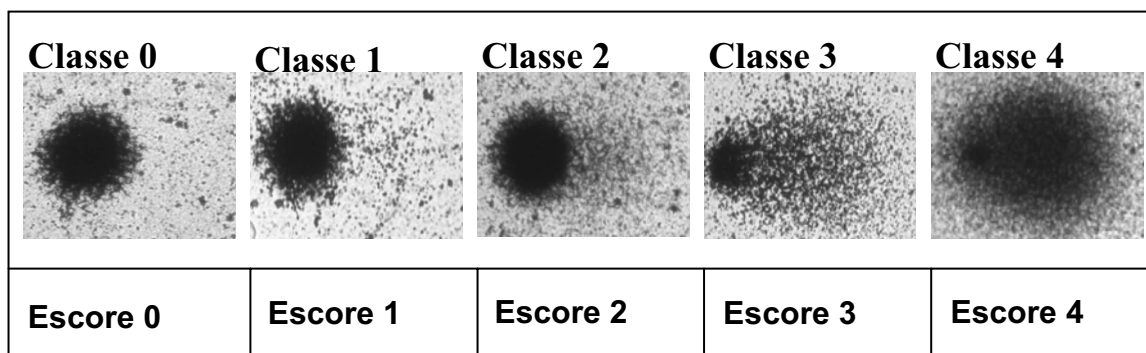


Figura 8. Imagens representativas das amostras feitas nos ensaios do cometa. Imagens dos cometas, suas classes e a pontuação, de acordo com o tamanho da cauda, obtidas com microscópio marca Olympus modelo BX41 e câmera 3.3 mpixel QColor 3C da Q-imaging e programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging.

4.12. Identificação das Prx-2 e Prx-SO₃ em células C6 e N2a, por imunodeteção

Para a imunodeteção, as células C6 e N2a tratadas em garrafas no volume de 5 mL. Após tratamentos com os inibidores das enzimas antioxidantes e peróxidos, as células C6 ou N2a foram essuspensas em tampão NEM, contendo inibidor de protease e catalase (10 µg/ml). As linhagens celulares, após adição do tampão NEM, ficaram incubando por 15 minutos em temperatura ambiente (~25 °C) e em seguida foi adicionado 1 % de detergente CHAPS à solução para solubilização das proteínas (COX *et al.*, 2008).

O extrato protéico foi diluído em tampão contendo 65,8 mM de tris-HCl, pH 6,8, 10,5 % de glicerol, 2,1 % de SDS e 0,053 % azul de bromofenol, numa proporção de 4 para 1. A separação das proteínas (30 µg por poço) foi feita por eletroforese em gel de acrilamina (SDS-PAGE) 10 % por 60 minutos a 150 V/65 mA, utilizando tampão de corrida contendo 25 mM de Tris , 190 mM de glicina e 0,1 % de SDS. Para a eletrotransferência utilizou-se membranas de nitrocelulose, com uma migração de 50 minutos a 4 °C, a 100 V, com tampão contendo 25 mM de Tris, 190 mM de glicina e 5 % de metanol.

As membranas foram lavadas com tampão TBST (100 mM de Tris/HCl, 150 mM de NaCl e 0,1 % de Tween 20 0,1% e bloqueadas com leite desnatado a 5% durante 90 minutos, lavadas novamente com TBST e depois incubadas durante 12 horas a 4° C com anticorpo primário para Prx-II (1:10.000) ou para forma superoxidada (SO₃) da Prx (1:3.000).

Em seguida as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com TBST e incubadas durante 60 minutos com anticorpo secundário (1:10.000). A detecção foi feita através da exposição a filme de alta performance ECL e reveladores e fixadores Kodak. Para controle de conteúdo de proteína foi utilizada β -Actina (1:20.000), além do uso de marcadores de peso molecular.

4.13. Análise estatística

Foi utilizada a variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Duncan, quando necessário, para análise dos resultados obtidos durante os experimentos. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.14. Proteínas

A quantificação de proteínas será determinada pelo método descrito por Bradford (1976). A albumina do soro bovino será utilizada para fazer uma curva padrão. A leitura será feita em espectrofotômetro em 595 nm.

5. Resultados

5.1. Efeito do BCNU, CDNB e AT na atividade das enzimas glutathiona redutase, tioredoxina redutase e catalase em fatias de hipocampo de ratos.

O BCNU, na concentração de 200 μ M, diminuiu em mais de 40 % a atividade da enzima GR nas fatias de hipocampo de ratos em relação controle-veículo. A redução foi além de 65 % quando utilizada a concentração de 500 μ M. No entanto, o CDNB 25 μ M e 50 μ M e o AT 50 mM não alteraram a atividade da enzima, como mostra a figura 9A.

A atividade da enzima TrxR foi reduzida em pouco mais de 24 % nas fatias tratadas com CDNB 25 μ M em relação ao controle-veículo. Na concentração de 50 μ M a redução foi além de 43 %. O BCNU 200 μ M e 500 μ M e o AT 50 mM não alteraram a atividade da enzima (figura 9B).

A CAT teve sua atividade reduzida em 34 % nas fatias de hipocampo de ratos tratadas com AT 50 mM, em relação ao controle, como mostra a figura 9C.

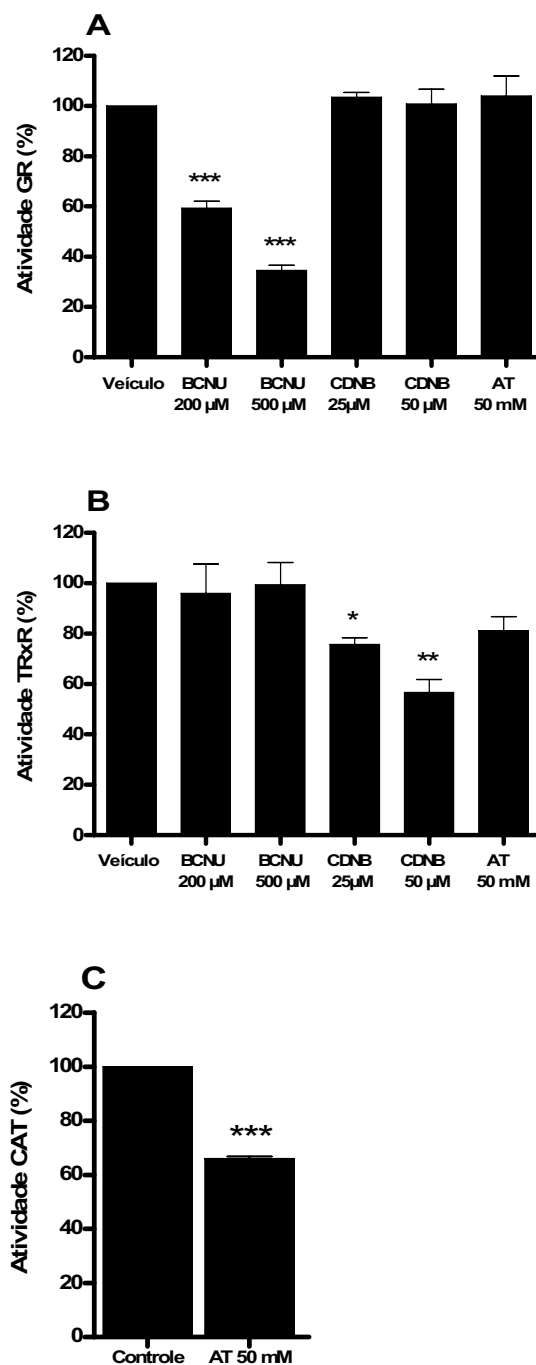


Figura 9. Atividade das enzimas glutathione peroxidase, tiorredoxina redutase e catalase em fatias de hipocampo de rato. As fatias de hipocampo foram tratadas durante 30 minutos com hepes-salina, BCNU, CDBN e AMT nas concentrações indicadas. Após esse período foi avaliada a atividade da GR (A) e TrxR (B). A figura (C) mostra a atividade da enzima CAT após tratamento com AT 50 mM, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média e estão expressos em porcentagem, sendo $n=3$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ representam diferenças significativas em relação ao grupo controle, como evidenciado pelo teste *post hoc* de Duncan.

5.2. Determinação das condições experimentais através da viabilidade celular em fatias de hipocampo expostas ao peróxido de hidrogênio em diversas concentrações.

A viabilidade decresce de uma maneira dose-dependente quando fatias de hipocampo são expostas ao H_2O_2 (BAHL, 2007; POSSER *et al.*, 2008). Como mostra a figura 10A, no delineamento experimental buscamos encontrar condições que nem os peróxidos, nem os inibidores produzissem efeitos *per se*. Por outro lado, os experimentos apresentados nas figuras 10B e 10C indicam que a inibição da GR ou da TrxR potencializaram o efeito do H_2O_2 somente na concentração de 300 μM , o que é melhor evidenciado quando as fatias foram pré-tratados com ambos os inibidores (figura 10D).

Por outro lado, a inibição da CAT com AT 50 mM potencializou o efeito do H_2O_2 nas concentrações mais elevadas, com diferenças estatísticas somente na concentração de 1 mM. Embora haja uma tendência à redução, o tratamento com H_2O_2 100 μM não alterou significativamente a viabilidade celular em nenhum dos tratamentos. Dessa forma, passamos a utilizar essa concentração nos experimentos subsequentes. Ao encontrarmos sinergismo entre a inibição da CAT, GR, TrxR e o dano oxidativo causado por peróxidos, pudemos comparar a eficiência dos sistemas de degradação de peróxidos contra um dano oxidativo agudo.

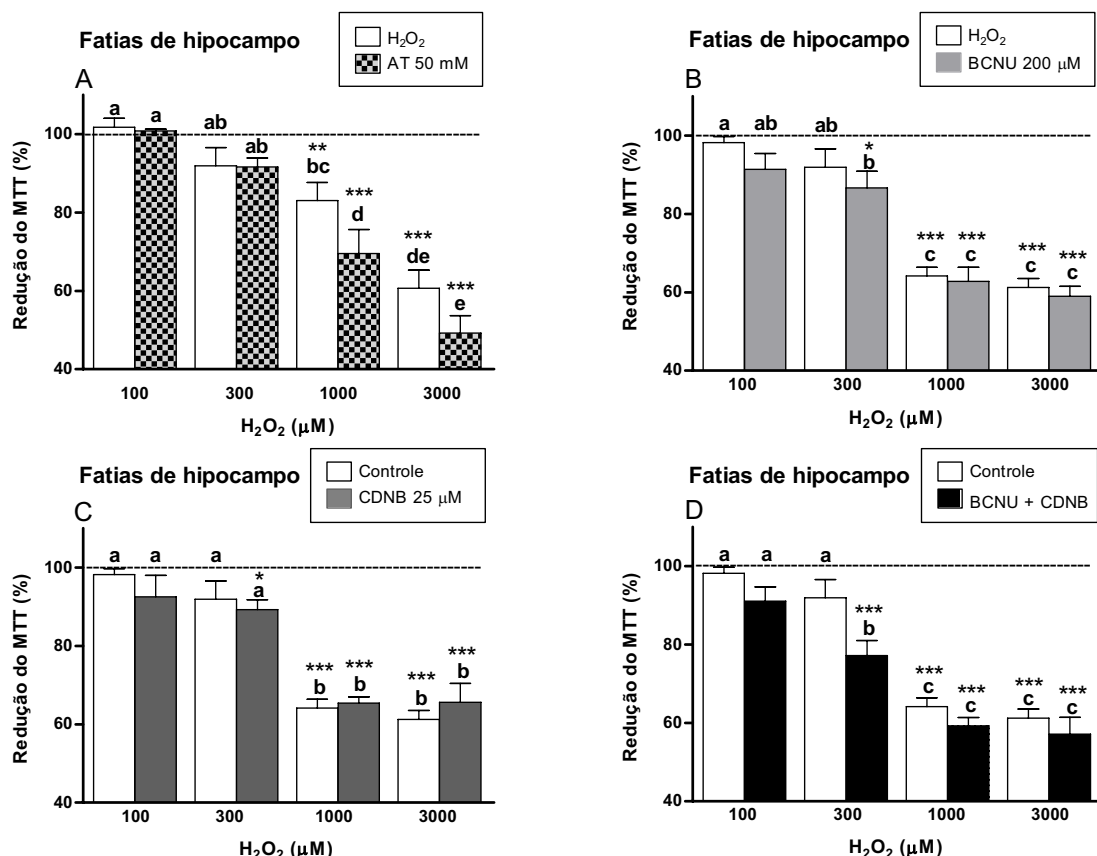


Figura 10. Viabilidade celular em fatias de hipocampo tratadas com AT, BCNU, e CDNB em várias concentrações de peróxido de hidrogênio. As fatias de hipocampo foram pré-tratadas por 30 minutos com hepes-salina, AT, BCNU, CDNB e com BCNU+CDNB nas concentrações indicadas e expostas durante 60 minutos aos peróxidos de hidrogênio 100, 300, 1000 e 3000 μM . A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média e estão expressos em porcentagem do controle ou veículo, sendo $n=3$. As diferenças significativas, quando houver, entre o controle ou veículo (linha tracejada) e os tratamentos, estão representadas pelo símbolo **($p<0,005$) e ***($p<0,001$); diferenças entre os grupos, estão representados por letras. Grupos que não compartilham letras possuem diferenças significativas entre si. ($p<0,05$), como evidenciado pelo teste *post hoc* de Duncan.

5.3. Degradação de peróxidos

A remoção de peróxidos pelas células é feita principalmente pelas enzimas CAT, GPx e Prx. A CAT atua somente no peróxido de hidrogênio, enquanto as duas outras enzimas reduzem, além do H_2O_2 , outros peróxidos orgânicos produzidos pela célula (DRINGEN *et al.*, 2005; RHEE *et al.*, 2003).

Nesse trabalho foram avaliados os efeitos dos inibidores enzimáticos na degradação de peróxido de hidrogênio e de cumeno. A concentração de peróxido escolhida foi de 100 μM , tanto nas fatias quanto nas linhagens celulares C6 e N2a, baseando-se em experimentos iniciais (figura 10).

Como os compostos BCNU e CDNB foram diluídos em etanol absoluto, foi avaliado seu efeito na degradação de peróxidos, pelo método PCA-FOX, e viabilidade celular, pela redução do MTT, conforme descrito em materiais e métodos, nas fatias de hipocampo e células C6 e N2a. Como mostra a figura 11, o etanol 0,38 %, diluído em tampão hepes-salina, não alterou os níveis de degradação de peróxidos e função mitocondrial das fatias entre o grupo controle e o veículo. Etanol a 0,38 % foi o percentual máximo utilizado como veículo nos tratamentos feitos nas fatias de hipocampo para as diluições do BCNU e CDNB.

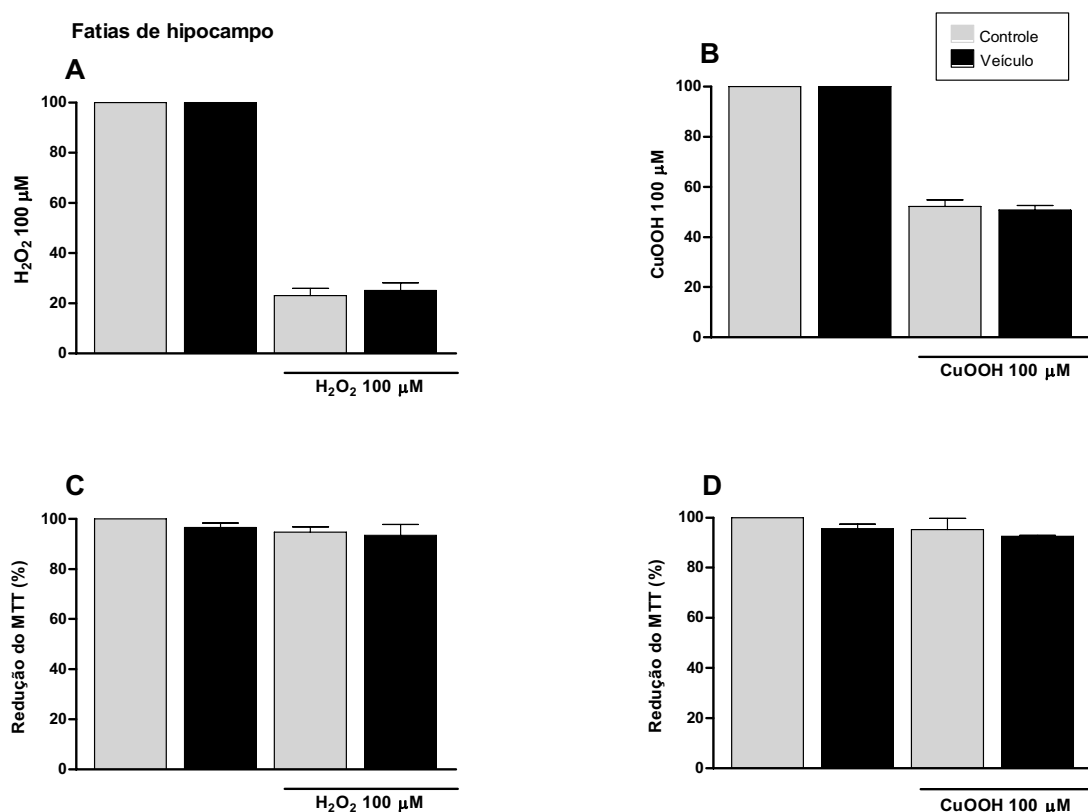


Figura 11. Degradação de peróxidos e viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos após tratamento com veículo-etanol e peróxidos. As fatias de hipocampo foram pré-tratadas por 30 minutos com meio hepes-salina ou etanol 0,38 % diluído em meio hepes-salina, em seguida: (A e C) tratadas com hepes-salina ou H_2O_2 100 μM por 60 minutos; (B e D) tratadas com hepes-salina ou CuOOH 100 μM por 90 minutos. Após esse período os níveis de peróxidos remanescentes foram avaliados pelo método PCA-FOX, e a viabilidade celular pela redução do MTT, como descrito em materiais e métodos. A análise de variância indicou que não houve diferenças significativas entre os respectivos tratamentos.

Nas células C6 e N2a também foi avaliado o efeito do etanol 0,09 %, diluído em tampão hepes-salina, na degradação de peróxido e viabilidade celular. Não houve alterações nesses dois parâmetros, tanto nas células C6 quanto N2a, como mostram as figuras 12 e 13. Etanol a 0,09 % foi o percentual máximo utilizado como veículo nos tratamentos feitos nas duas linhagens celulares como veículo para as diluições do BCNU e CDNB.

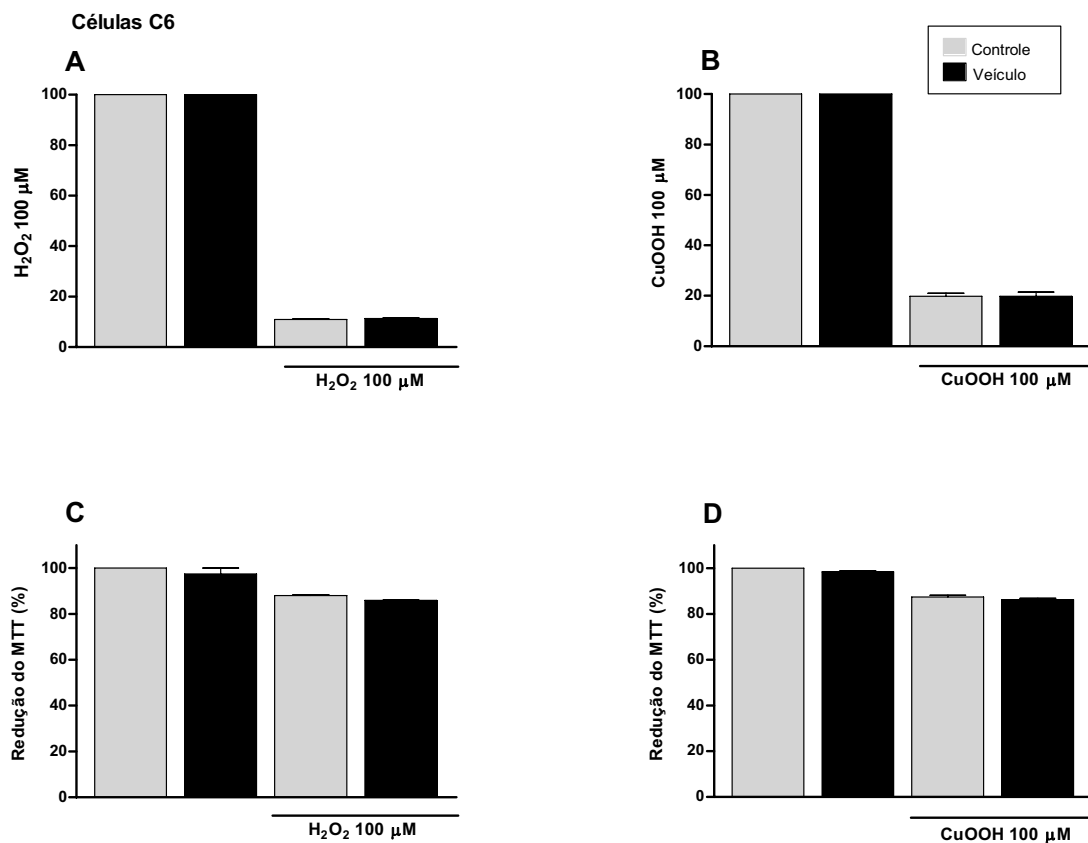


Figura 12. Degradação de peróxidos e viabilidade celular em células C6 após tratamento com veículo-etanol e peróxidos. As Células C6 foram pré-tratadas por 30 minutos com meio hepes-salina ou etanol 0,09 % diluído em meio hepes-salina, em seguida: foi adicionado H_2O_2 100 μM (A e C) diluído em hepes-salina por 60 minutos; ou CuOOH 100 μM (B e D) por 60 minutos. Após esse período o consumo de peróxidos foi avaliado pelo método PCA-FOX, e a viabilidade celular pela redução do MTT, como descrito em materiais e métodos. A análise de variância indicou que não houve diferenças significativas entre os respectivos tratamentos.

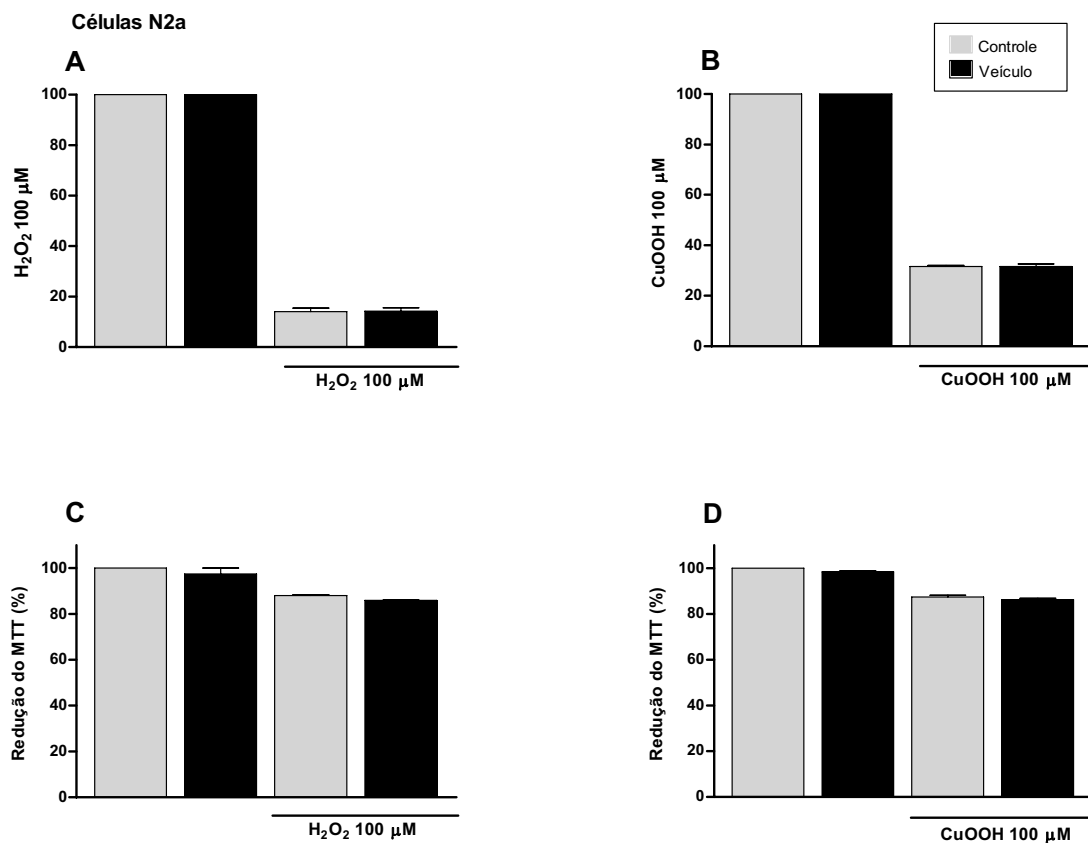


Figura 13. Degradação de peróxidos e viabilidade celular em células N2a após tratamento com veículo-etanol e peróxidos. As Células N2a foram pré-tratadas por 30 minutos com meio hepes-salina ou etanol 0,09 % diluído em meio hepes-salina, em seguida: foi adicionado H₂O₂ 100 μM (A e C) diluído em hepes-salina por 60 minutos; ou CuOOH 100 μM (B e D) por 60 minutos. Após esse período o consumo de peróxidos foi avaliado pelo método PCA-FOX, e a viabilidade celular pela redução do MTT, como descritos em materiais e métodos. A análise de variância indicou que não houve diferenças significativas entre os respectivos tratamentos.

5.4. Efeito do AT na degradação de peróxido de hidrogênio em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a.

As fatias de hipocampo e células C6 e N2a foram submetidas ao pré-tratamento de 30 minutos com AT 50 mM, e em seguida expostas por 60 minutos ao H₂O₂ na concentração de 100 µM. Como mostra a figura 14A, as fatias consumiram de maneira significativa o peróxido presente no meio. Quando comparadas ao grupo controle, houve uma menor degradação de peróxido aos 10, 30 e 60 minutos de tratamento (7,8 %, 25,5 % e 59,9 %, respectivamente) quando as células foram pré-tratadas com AT 50 mM.

Nas células C6 não houve diferenças significativas no consumo de peróxidos nos três intervalos avaliados (figura 14B).

Como mostra a figura 14C, as células N2a consumiram de maneira significativa o peróxido presente no meio. As células N2a apresentaram tendência na redução do consumo de peróxido durante o tratamento, mas a diferença somente foi significativa aos 60 minutos (88,1 %).

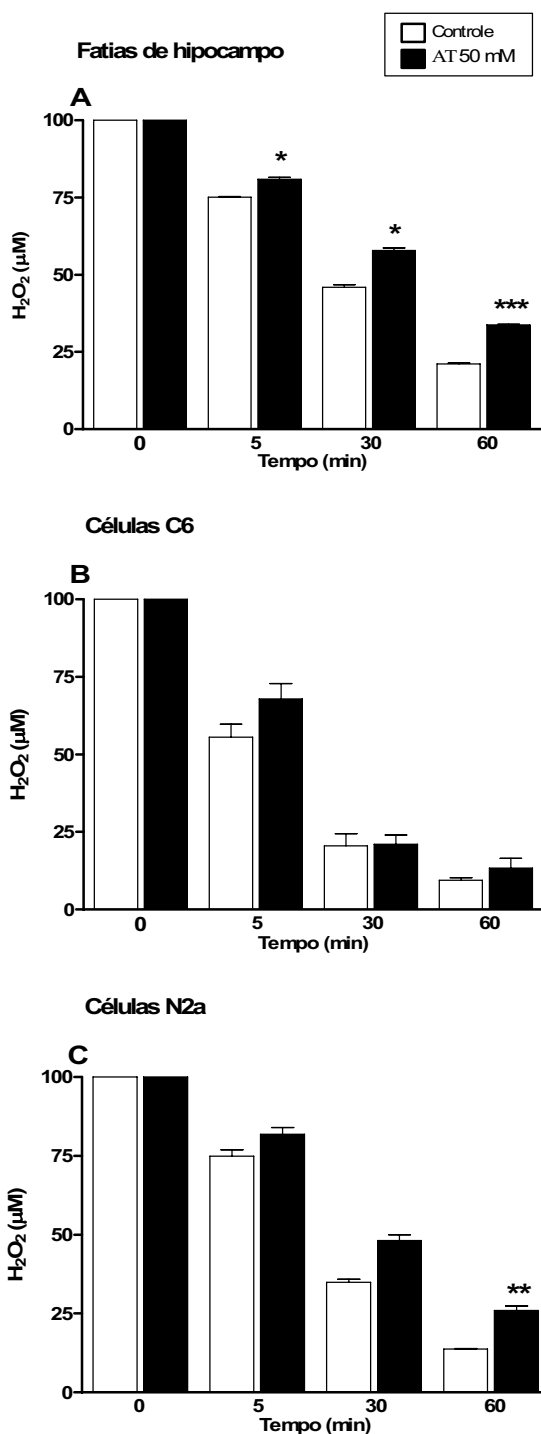


Figura 14. Efeito do AT na degradação de peróxido de hidrogênio 100 μM em fatias de hipocampo e células C6 e N2a. As fatias e as duas linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos com o meio hepes-salina ou AT 50 mM e expostas durante 60 minutos ao peróxido de hidrogênio 100 μM. Os níveis de peróxidos foram medidos, nos tempos indicados, pelo método PCA-FOX, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam média ± erro padrão da média e estão expressos em concentração de peróxido, sendo n=3. *p<0,05, **p<0,005 e ***p<0,001 indicam diferenças significativas em relação ao controle de cada intervalo, como evidenciado pelo teste *post hoc* de Duncan.

5.5. Efeito do BCNU e do CDNB na degradação de peróxido de hidrogênio em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a.

As fatias de hipocampo foram pré-tratadas por 30 minutos com BCNU 500 μ M, CDNB 50 μ M ou BCNU 500 μ M + CDNB 50 μ M, em seguida foram incubadas com H_2O_2 100 μ M durante 60 minutos. Como mostra a figura 15, as fatias ou células consumiram de maneira significativa o peróxido presente no meio apresentando uma dependência temporal.

Quando comparado à incubação feita somente com peróxido de hidrogênio, o consumo de peróxido apresentou queda significativa nos três intervalos avaliados quando as fatias foram tratadas com os inibidores. Essa diferença só não foi significativa em relação ao tratamento com CDNB nos intervalos de 05 e 60 minutos. Nos demais, houve redução significativa aos cinco minutos, de 23,3 % em relação ao BCNU e 25,1 % ao BCNU+CDNB; aos 30 minutos, 47,4 % ao BCNU; 20,6 % ao CDNB e 47,6 % ao BCNU+CDNB; aos 60 minutos, 46 % ao BCNU, 27,5 % ao CDNB, e 89,3 % ao BCNU+CDNB (Figura 15A).

As fatias que receberam BCNU apresentaram menor consumo de peróxido aos 05 e 30 minutos, quando comparadas ao CDNB, quando houve diferença significativa entre esses grupos (11.6 % e 22.2 % respectivamente). A inibição do consumo de peróxidos pela combinação BCNU+CDNB foi mais evidente em relação aos inibidores isolados aos 60 minutos de incubação (Figura 15A).

As células C6 foram pré-tratadas durante 30 minutos BCNU 100 μ M, CDNB 25 μ M ou a combinação BCNU 100 μ M + CDNB 25 μ M. Em seguida foram incubadas por 60 minutos com peróxido de hidrogênio 100 μ M. Os procedimentos com as células N2a foram idênticos aos da C6, com a exceção de que receberam somente 10 μ M de CDNB durante os tratamentos.

Como mostra a figura 15B, as células C6 tratadas com BCNU, CDNB e a combinação dos dois inibidores apresentaram reduções significativas na capacidade de degradação de peróxido de hidrogênio no intervalo de 05 minutos, em todos os grupos avaliados, quando

comparadas às células tratadas somente com H_2O_2 (32 % BCNU 100 μM , 26,2 % CDNB 25 μM , e 36,3 % BCNU 100 μM + CDNB 25 μM). Todos os grupos pré-tratados com inibidores neste tempo apresentaram consumo de peróxidos similares entre si. Aos 30 minutos de incubação, os grupos avaliados não apresentaram diferenças significativas entre si. Após 60 minutos de incubação, foi observada tendência na redução do consumo de peróxidos entre as células C6 tratadas com os inibidores em comparação com o grupo tratado somente com peróxido de hidrogênio. No entanto, essa redução somente foi significativa para as células tratadas com BCNU+ CDNB (176,7 %). Não houve diferenças significativas no consumo de peróxido entre os grupos pré-tratados com inibidores.

Entre as células N2a, não houve diferenças significativas no consumo de peróxido de hidrogênio nos intervalos de 05 e 30 minutos entre todos os grupos avaliados. Aos 60 minutos, houve redução significativa no consumo de peróxidos nos grupos de células tratadas com inibidores, quando comparadas às submetidas somente ao peróxido de hidrogênio (67 % BCNU 100 μM , 47,8 % CDNB 10 μM ; e 84,1% BCNU 100 μM + CDNB 10 μM , respectivamente). Não houve diferenças significativas no consumo de peróxido entre os grupos pré-tratados com inibidores nesse intervalo (Figura 15C).

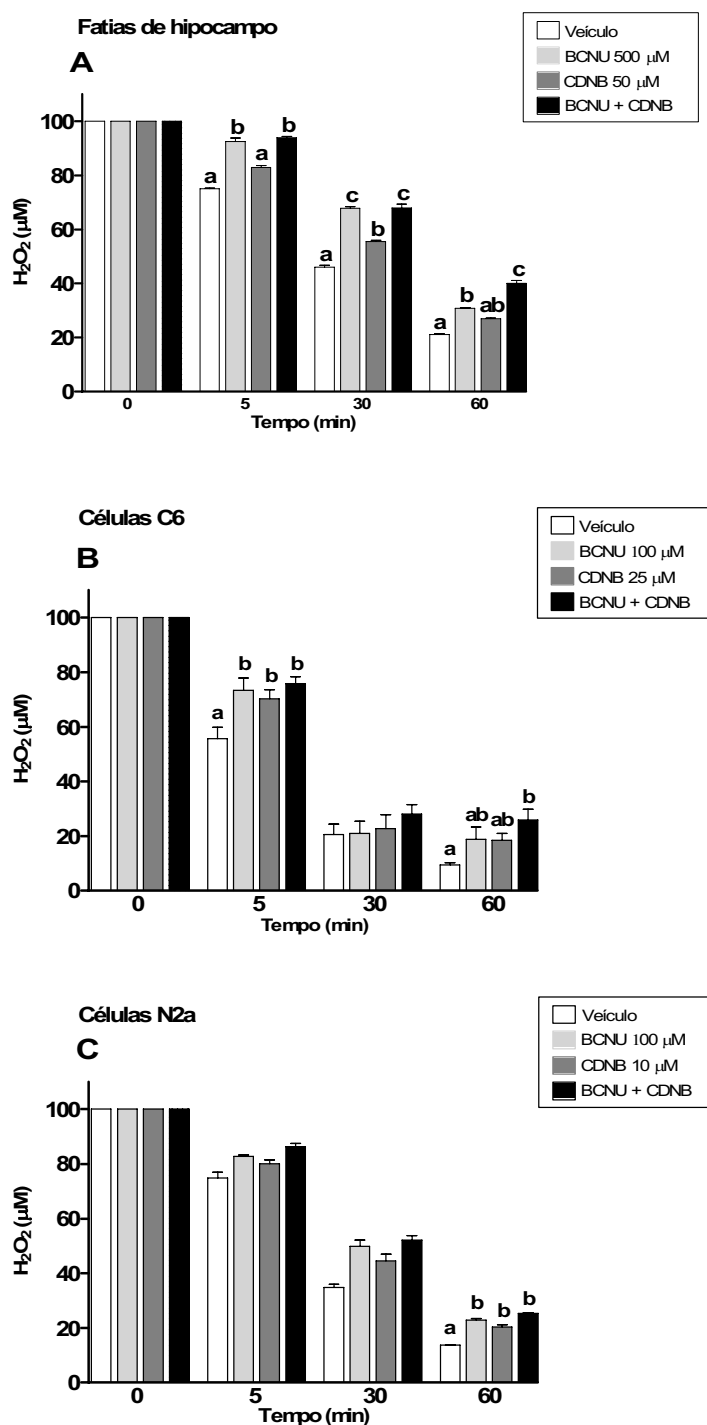


Figura 15. Efeito do BCNU e CDNB na degradação de peróxido de hidrogênio 100 μ M em fatias de hipocampo e células C6 e N2a. As fatias e as duas linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos com hepes-salina, BCNU, CDNB ou com ambos, nas concentrações indicadas, e expostas durante 60 minutos ao peróxido de hidrogênio 100 μ M. Os níveis de peróxidos foram medidos, nos tempos indicados, pelo método PCA-FOX, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média e estão expressos em concentração de peróxido, sendo $n=3$. Os grupos que não compartilham a mesma letra possuem diferenças significativas entre si. ($p<0,05$), como evidenciado pelo teste *post hoc* de Duncan.

5.6. Efeito do BCNU e do CDNB na degradação de peróxido de cumeno em fatias de hipocampo de ratos e linhagens de células C6 e N2a.

Os grupos experimentais foram idênticos àqueles descritos no item 4.2.2, exceto que se utilizou CuOOH 100 μ M durante 90 minutos, ao invés de H₂O₂. Na figura 16, observa-se que houve um decréscimo progressivo nos níveis de peróxidos presentes no meio, indicando a capacidade de degradação de peróxidos orgânicos pelos três modelos em estudo. É intrigante o fato que tanto fatias de hipocampo quanto células C6 ou N2a tem uma capacidade de degradação de peróxidos orgânicos em torno de 2 vezes menor, se comparada à capacidade de degradação de H₂O₂, indicando que a capacidade de degradação de peróxidos é proporcional nos três modelos. Apesar de não termos relativizado pela quantidade de proteínas, nas condições experimentais utilizadas, as células C6 têm aproximadamente o dobro da capacidade de degradação de ambos os peróxidos, enquanto fatias de hipocampo e células N2a têm taxas de degradação semelhantes.

As fatias apresentaram reduções significativas no consumo de peróxidos, quando comparadas ao grupo que foi exposto somente ao peróxido de cumeno, nos intervalos de 60 (19,2 % BCNU, 19,2 % CDNB e 24,8 % BCNU + CDNB) e 90 minutos (31 % BCNU, 21 % CDNB e 30,7 % BCNU + CDNB). Não houve diferenças significativas entre os grupos pré-tratados somente com inibidores em todos os intervalos de tempo avaliados (Figura 16A).

Nas células C6, houve reduções significativas na capacidade de degradar peróxidos entre os grupos pré-tratados com BCNU, CDNB ou a combinação dos dois inibidores, quando comparados com células expostas somente ao peróxido de cumeno 100 μ M em todos os intervalos avaliados (16,8 %, 85,8 %, 320,1 % BCNU; 100 μ M, 17,8 %, 99,6 %, 391,8 % CDNB 25 μ M; e 14,7 %, 95,7 e 394,1 % BCNU 100 μ M + CDNB 25 μ M, aos 10, 30 e 60 minutos, respectivamente). No que se refere aos grupos de inibidores, somente foram observadas diferenças significativas entre os grupos pré-tratados aos 60 minutos, quando o consumo de peróxido foi menor nas células pré-tratadas com CDNB 25 μ M (17,1 %) ou

BCNU 100 μ M + CDNB 25 μ M (17,6 %) em relação às pré-tratadas com BCNU 100 μ M (Figura 16B).

As células N2a pré-tratadas com os inibidores BCNU, CDNB ou ambos, tiveram um comprometimento significativo do consumo de peróxidos quando comparadas àquelas tratadas somente com peróxido de cumeno 100 μ M nos intervalos de 10, 30 e 60 minutos (7,4 %, 30,5 %, 109,3 % BCNU 100 μ M; 10 %, 32,5 %; 93,4 % CDNB 10 μ M; e 13,4 %, 45,3 % e 167,6 % BCNU 100 μ M + CDNB 10 μ M, respectivamente). Diferenças significativas entre os grupos tratados com inibidores somente ocorreram após 60 minutos de incubação, quando houve menor consumo de peróxidos nas células N2a pré-tratadas com BCNU 100 μ M + CDNB 10 μ M em relação às pré-tratadas com CDNB 10 μ M (38,3 %; figura 16C).

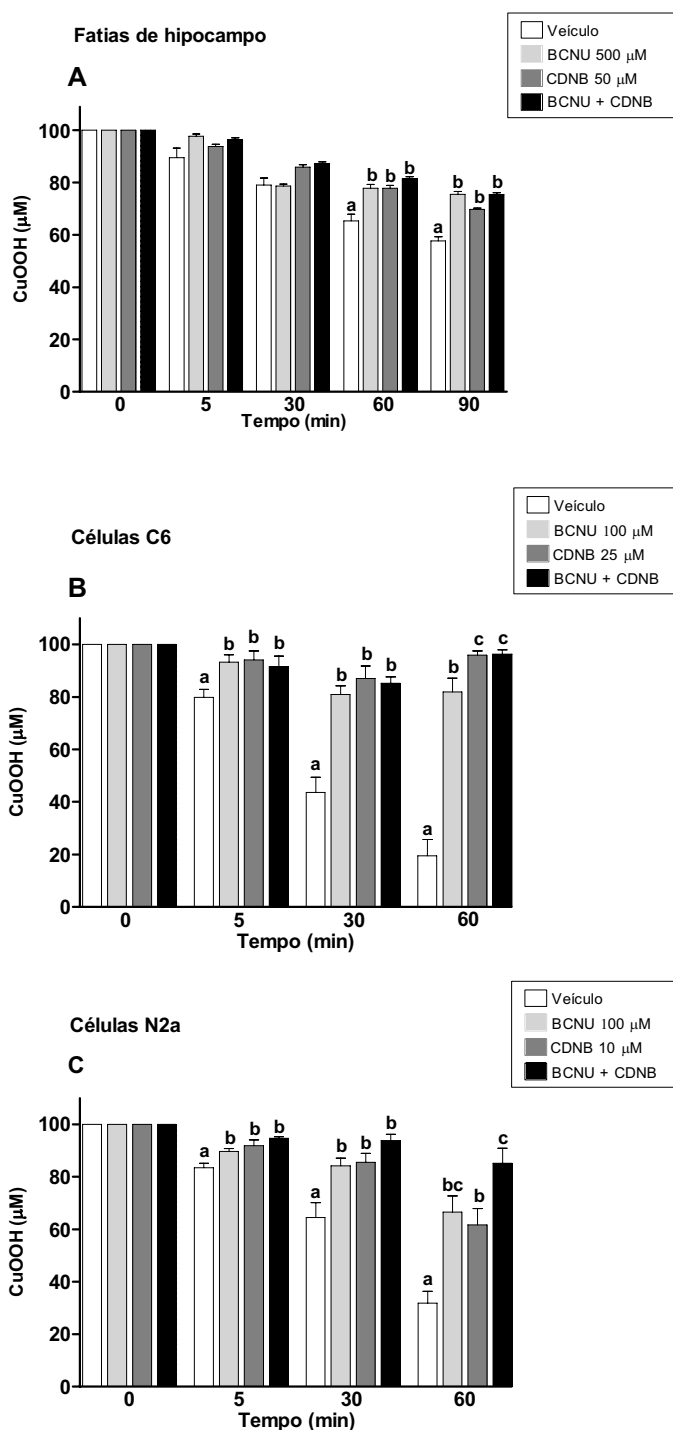


Figura 16. Efeito do BCNU e CDNB na degradação de peróxido de cumeno 100 μ M em fatias de hipocampo de rato e células C6 e N2a. As fatias e as duas linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos com hepes-salina, BCNU, CDNB ou com ambos, nas concentrações indicadas. As fatias foram expostas por 90 minutos e as células por 60 minutos de tratamento com peróxido de cumeno 100 μ M. Os níveis de peróxidos foram medidos, nos tempos indicados, pelo método PCA-FOX, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média e estão expressos em concentração de peróxido, sendo $n=3$. Os grupos que não compartilham a mesma letra possuem diferenças significativas entre si. ($p<0,05$), conforme verificado pelo teste *post hoc* de Duncan.

5.7. Efeito do AT na viabilidade celular em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio.

Os ensaios com MTT realizados em fatias de hipocampo e células C6 e N2a, utilizaram as mesmas concentrações de inibidores e peróxidos de hidrogênio e cumeno e tempos de incubação dos itens anteriores. O objetivo foi avaliar se os efeitos dos inibidores enzimáticos observados na degradação de peróxidos influenciariam a viabilidade celular, avaliada por meio da formação do composto formazam, após a adição de MTT (LEEMAN *et al.*, 1995).

O tratamento com AT 50 mM não alterou a viabilidade celular das fatias de hipocampo e das células C6 incubadas por 60 minutos com peróxido de hidrogênio, como mostram as figuras 17A e 17B. Por outro lado, as células N2a foram mais sensíveis e apresentaram diminuição na viabilidade celular de 15,9 % após o pré-tratamento somente com H₂O₂. A inibição da catalase pelo pré-tratamento com AT 50 mM potencializou este efeito, levando a uma redução da viabilidade em mais de 42 % (figura 17C). O pré-tratamento com AT não alterou a viabilidade celular, (figura 17), indicando que em situações basais a menor capacidade de um dos sistemas de degradação de peróxidos não compromete a viabilidade celular nas condições estudadas.

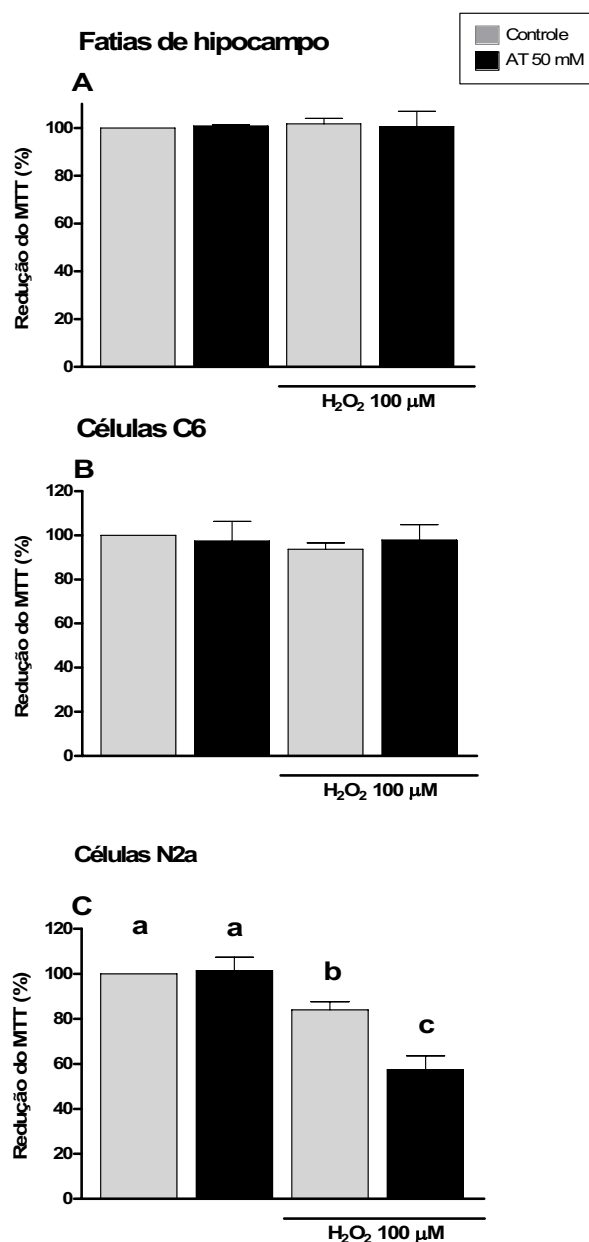


Figura 17. Viabilidade celular de fatias de hipocampo, células C6 e N2a pré-tratadas com AT 50 mM e subsequentemente expostas ao peróxido de hidrogênio. As fatias de hipocampo e as duas linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos no meio hepes-salina (controle) ou com AT 50 mM. Após esse período, os grupos foram expostos ao peróxido de hidrogênio 100 μM por 60 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam média ± erro padrão da média e estão expressos em porcentagem, sendo n=3. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos feitos nas fatias de hipocampo e células C6. Para as células N2a, os grupos que não compartilham letras possuem diferenças significativas entre si (p<0,05), como mostrou o teste *post hoc* de Duncan

5.8. Efeito do BCNU e do CDNB na viabilidade celular em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio e de cumeno.

O pré-tratamento por 30 minutos com BCNU 500 μ M, CDNB 50 μ M, ou ambos, seguido de incubação com peróxido de hidrogênio durante 60 minutos, não alterou a viabilidade celular das fatias de hipocampo. Somente foi observada redução significativa, de 9,3 % em relação ao grupo controle quando foi utilizada a combinação de ambos (figura 18A).

O peróxido de hidrogênio não afetou a viabilidade celular das fatias, no entanto, quando houve pré-tratamento com os inibidores e posterior adição de peróxido, a viabilidade diminuiu nas fatias pré-tratadas com BCNU (16,8 %), CDNB (10,3 %) e na combinação de ambos (27,5 %), em relação grupo veículo. Na comparação feita entre as fatias pré-incubadas com os inibidores, sem a adição e com a adição de peróxido de hidrogênio, a viabilidade somente não foi alterada entre os grupos que receberam o CDNB. Nos demais, houve comprometimento significativo da viabilidade celular (figura 18A).

Como mostra a figura 18B, o pré-tratamento com BCNU 500 μ M, ou a combinação dos dois inibidores, reduziu significativamente a viabilidade celular das fatias em 9,7 e 12 %, respectivamente, mas não houve alterações quando foram expostas somente ao CDNB 50 μ M. Quando as fatias foram expostas ao peróxido de cumeno 100 μ M, não foi observado efeito sobre a viabilidade. No entanto, a adição de peróxido de cumeno após o pré-tratamento com os inibidores, reduziu significativamente a viabilidade celular das fatias em relação ao grupo veículo (24,8 % para o BCNU, 14,4 % para o CDNB e 31,4 % para BCNU + CDNB). Na comparação entre as fatias tratadas ou não com peróxido de cumeno, mas antes pré-incubadas com os inibidores, a viabilidade celular somente não foi alterada significativamente entre os grupos que receberam o CDNB (figura 18B).

Como descrito acima, e evidenciado na figura 18A e 18B, pode-se perceber que o comprometimento dos sistemas de degradação de peróxidos dependentes da GPx e da Prx

potencializaram o efeito do H_2O_2 . A inibição somente da GR ou da GR+TrxR foram mais eficientes que o CDNB isoladamente em comprometer a viabilidade celular.

As duas linhagens celulares apresentaram maior sensibilidade quando pré-tratadas com os inibidores. Como nosso objetivo era comprovar que o comprometimento dos sistemas dependentes de GPx e Prx reduzem as defesas celulares contra agentes oxidantes, nos ensaios as células foram pré-tratadas com menores concentrações de BCNU e CDNB. O pré-tratamento com BCNU 100 μM , CDNB 25 μM e a combinação de ambos, seguido da incubação de 60 minutos com hepes-salina, reduziu a viabilidade celular nas células C6 de forma significativa em relação ao veículo (14,2, 23,4 e 25,1 %, respectivamente; figura 18C). Tanto o BCNU, o CDNB ou a combinação de ambos, resultou em uma redução da viabilidade celular, mesmo que em menores concentrações.

As células C6, da mesma forma que as fatias de hipocampo, não apresentaram alterações na viabilidade celular quando expostas somente ao peróxido de hidrogênio 100 μM . No entanto, o pré-tratamento com os inibidores, seguido da adição de peróxido de hidrogênio, potencializou os efeitos dos inibidores, reduzindo a viabilidade dessa linhagem quando exposta ao BCNU (57,4 %) ou à combinação de ambos (61,3 %). Nas células pré-tratadas com CDNB, não houve diferença significativa quando foram subsequentemente expostas ao peróxido de hidrogênio H_2O_2 100 μM (figura 18C), ou seja, o tratamento com CDNB não potencializou o efeito do H_2O_2 .

A incubação com peróxido de cumeno não afetou a viabilidade celular células C6. A pré-incubação com os inibidores reduziu a viabilidade celular, o que não foi acentuado pelo tratamento com CuOOH (figura 18C). Esses dados sugerem que a menor capacidade de degradar peróxidos orgânicos não compromete a viabilidade das células C6 quando expostas agudamente a peróxidos orgânicos.

As células N2a foram pré-tratadas com BCNU 100 μM , CDNB 10 μM ou a combinação de ambos, e em seguida foram incubadas com hepes-salina (veículo) ou H_2O_2 .

Nessas células, a redução da viabilidade celular somente foi significativa em relação ao grupo veículo quando houve a combinação dos dois inibidores (32,1 %), como mostra a figura 18D. A incubação somente com peróxido de hidrogênio 100 μ M reduziu a viabilidade celular em mais de 15 %, ao contrário das fatias de hipocampo e células C6, onde não foi observada essa redução. A adição de peróxido de hidrogênio, após a pré-incubação com os inibidores, diminuiu ainda mais a viabilidade das células N2a, em torno de 50 % nos três grupos avaliados (figura 18 D), demonstrando que a deficiência de um dos sistemas de degradação de peróxidos compromete significativamente a sobrevivência em condições de estresse oxidativo

As células N2a não foram afetadas em relação à viabilidade celular em relação ao veículo quando incubadas com peróxido de cumeno por 60 minutos. Após a pré-incubação com os inibidores, a viabilidade celular decaiu significativamente somente com a combinação dos inibidores. O subsequente tratamento com CuOOH 100 μ M acentou levemente o efeito dos inibidores, sendo que, em relação ao grupo veículo, os grupos BCNU (22,2 %) e CDNB (23,1 %) passaram a ter menor viabilidade (figura 18D). Entretanto, na comparação com os grupos pré-tratados com os inibidores, o CuOOH não teve nenhum efeito, ou seja, não agravou a viabilidade celular, indicando mais uma vez que a inibição da GR e/ou TrxR não interferem na sensibilidade aos peróxidos orgânicos, apesar de que somente a inibição destas enzimas é suficiente para levar a uma perda da viabilidade.

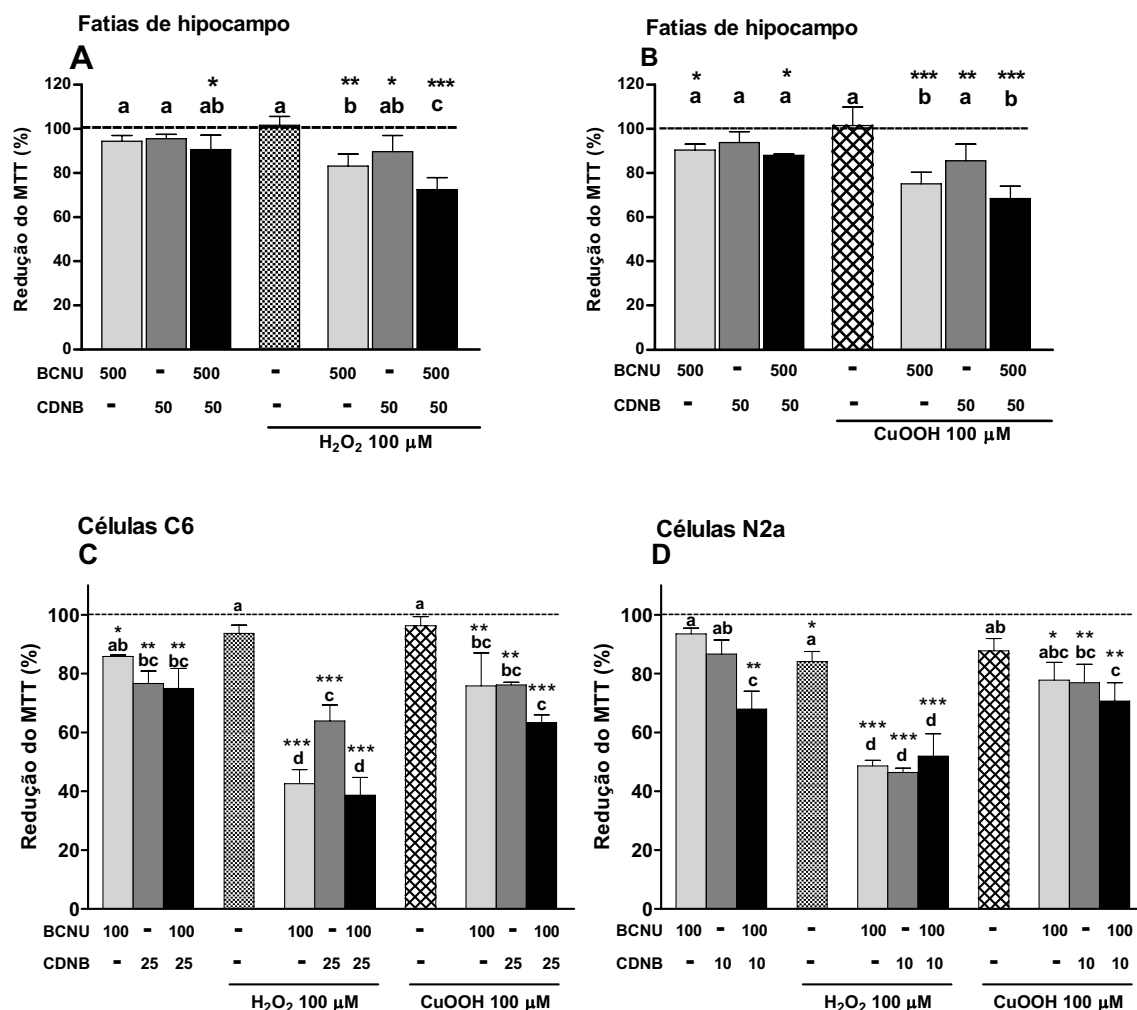


Figura 18. Viabilidade celular em fatias de hipocampo e células C6 e N2a tratadas com BCNU, CDNB e peróxidos. As fatias de hipocampo e as linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos com veículo, BCNU, CDNB ou com ambos, nas concentrações indicadas. Após esse período, um grupo foi incubado com hepes-salina e outro com peróxidos. Nas fatias de hipocampo tratadas com peróxido de hidrogênio (**A**) o tempo de incubação foi de 60 minutos, enquanto nas tratadas com peróxido de cumeno (**B**) o tempo foi de 90 minutos. Nas duas linhagens celulares (**C** e **D**), a incubação com peróxidos foi de 60 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média e estão expressos em porcentagem, sendo $n=3$. As diferenças significativas, quando houver, entre o veículo (linha tracejada) e os tratamentos, estão representadas por * $p<0,05$, ** $(p<0,005)$ e *** $(p<0,001)$; comparações entre os demais grupos, estão representados por letras. Grupos que não compartilham letras possuem diferenças significativas entre si. ($p<0,05$), utilizando o teste *post hoc* de Duncan.

5.9. Efeito do AT na permeabilidade celular em fatias de hipocampo, células C6 ou células N2a expostas ao peróxido de hidrogênio.

A permeabilidade celular foi avaliada pela incorporação do IP, que atravessa somente as células mortas ou com membranas danificadas e se complexa ao DNA, causando aumento na intensidade da fluorescência (SANO *et al.*, 1994). O aumento da intensidade da fluorescência, que detecta células em necrose (OSUCHOWSKI e SHARMA, 2005) foi medida por fluorímetro, como descrito em Materiais e Métodos.

As fatias de hipocampo e as células C6 e N2a foram expostas às mesmas concentrações de inibidores, de peróxido e tempos de incubação dos itens anteriores. O tratamento com AT 50 mM, com e sem a administração de peróxido de hidrogênio 100 μ M, não causou nenhum efeito aparente na permeabilidade células das fatias de hipocampo e células C6 e N2a, como mostra a figura 19.

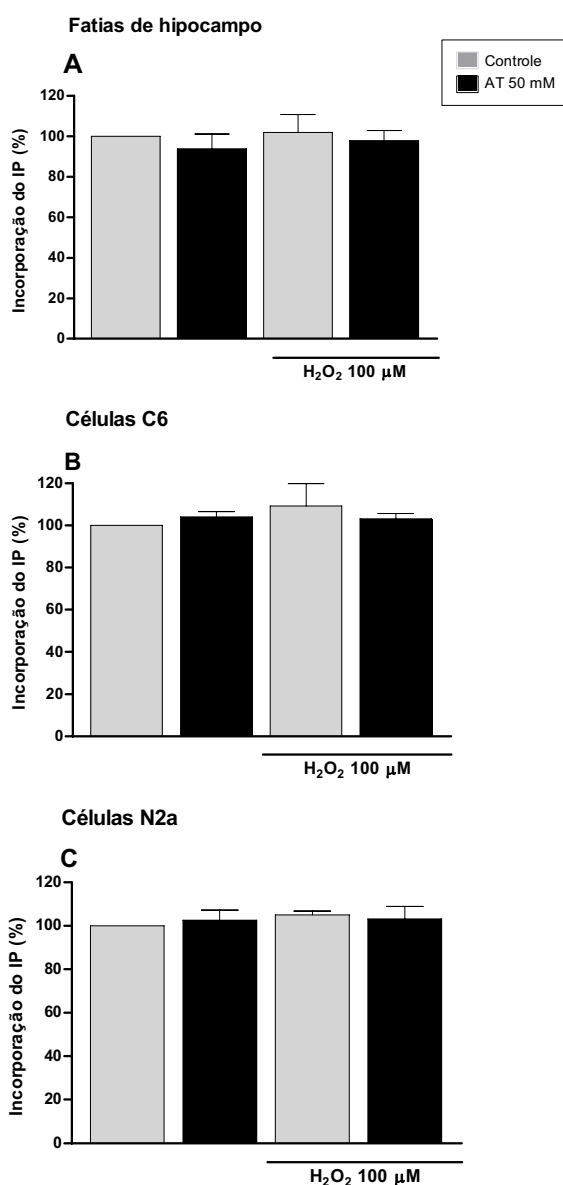


Figura 19. Permeabilidade celular de fatias de hipocampo e células C6 e N2a tratadas com AT 50 mM e/ou peróxido de hidrogênio. As fatias de hipocampo e as linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos no meio hepes-salina (fatias controle e às expostas somente ao peróxido de hidrogênio) ou com AT 50 mM. Em seguida, os grupos controle e AT 50 mM, foram incubados com tampão hepes-salina ou com peróxido de hidrogênio 100 μM durante 60 minutos. A permeabilidade celular foi avaliada pela incorporação do IP, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam média ± erro padrão da média e estão expressos em porcentagem, sendo n=3. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, utilizando o teste *post hoc* de Duncan.

5.10. Efeito do BCNU e do CDNB na permeabilidade celular em fatias de hipocampo, células C6 e células N2a expostas ao peróxido de hidrogênio ou de cumeno

Os únicos grupos expostos ao H_2O_2 que tiveram aumento significativo na permeabilidade celular das fatias de hipocampo foram aqueles pré-tratados com BCNU (26,6 %) ou pré-tratados com BCNU+CDNB e tratados com H_2O_2 (29,2 %; figura 20A). Os únicos grupos que tiveram aumento significativo na permeabilidade celular das fatias de hipocampo tratadas com CuOOH foram aqueles pré-tratados com CDNB (26,2 %) ou pré-tratados com BCNU+CDNB e tratados com CuOOH (27,1 %; figura 20B).

O pré-tratamento com BCNU ou CDNB, sem a adição de peróxidos, não alteraram a permeabilidade celular das células C6, quando comparadas ao veículo. No entanto, a combinação dos dois inibidores aumentou a permeabilidade celular dessas células em 67,7 % (figura 20C). A incubação somente com peróxido de hidrogênio 100 μM não induziu aumento da permeabilidade nessas células. O pré-tratamento com BCNU, que isolado não havia influenciado na permeabilidade dessas células, teve efeito significativo quando houve incubação posterior com peróxido de hidrogênio, ultrapassando 96 % em relação ao veículo. A combinação dos dois inibidores, com a adição de peróxido, aumentou em mais de 100% a permeabilidade das células C6, uma diferença maior do que 32 % em relação ao mesmo pré-tratamento sem a adição de peróxido. O tratamento somente com peróxido de cumeno não afetou a permeabilidade das células C6. Da mesma forma como ocorreu em relação ao tratamento com peróxido de hidrogênio, a adição de peróxido de cumeno 100 μM às células pré-tratadas com BCNU aumentou significativamente a permeabilidade dessas células, passando de 72 %, na comparação feita com o veículo. Os dois inibidores combinados aumentaram em mais de 100 % a permeabilidade celular em relação ao veículo. A diferença entre o pré-tratamento com BCNU+CDNB isolado, e o mesmo pré-tratamento, com posterior adição de peróxido de cumeno por 60 minutos, também aumentou ainda mais a permeabilidade celular em mais de 32 % (figura 20C).

Nas células N2a, os inibidores, isolados ou combinados, sem a adição de peróxidos, não afetaram a permeabilidade (figuras 20D), da mesma maneira que a incubação de H_2O_2 ou $CuOOH$ isoladamente. A pré-incubação com BCNU ou CDNB e posterior incubação com peróxido de hidrogênio 100 μM também não alterou a permeabilidade dessas células. Somente a combinação dos dois inibidores teve efeito significativo na permeabilidade após adição de H_2O_2 , ultrapassando pouco mais de 15 % em relação ao veículo, resultados bem diferentes dos observados nas células C6.

O peróxido de cumeno não afetou a permeabilidade das células N2a, da mesma forma que não houve alterações no pré-tratamento com CDNB, mais a adição de peróxido. Após a adição de peróxido de cumeno, o aumento da permeabilidade celular dessas células foi observado nos grupos pré-tratados com BCNU (11,7 %) e BCNU+CDNB (19 %) (figura 20D). na comparação com as células C6, as células N2a são muito mais resistentes ao aumento da permeabilidade causado somente pelo BCNU ou BCNU em combinação com peróxidos.

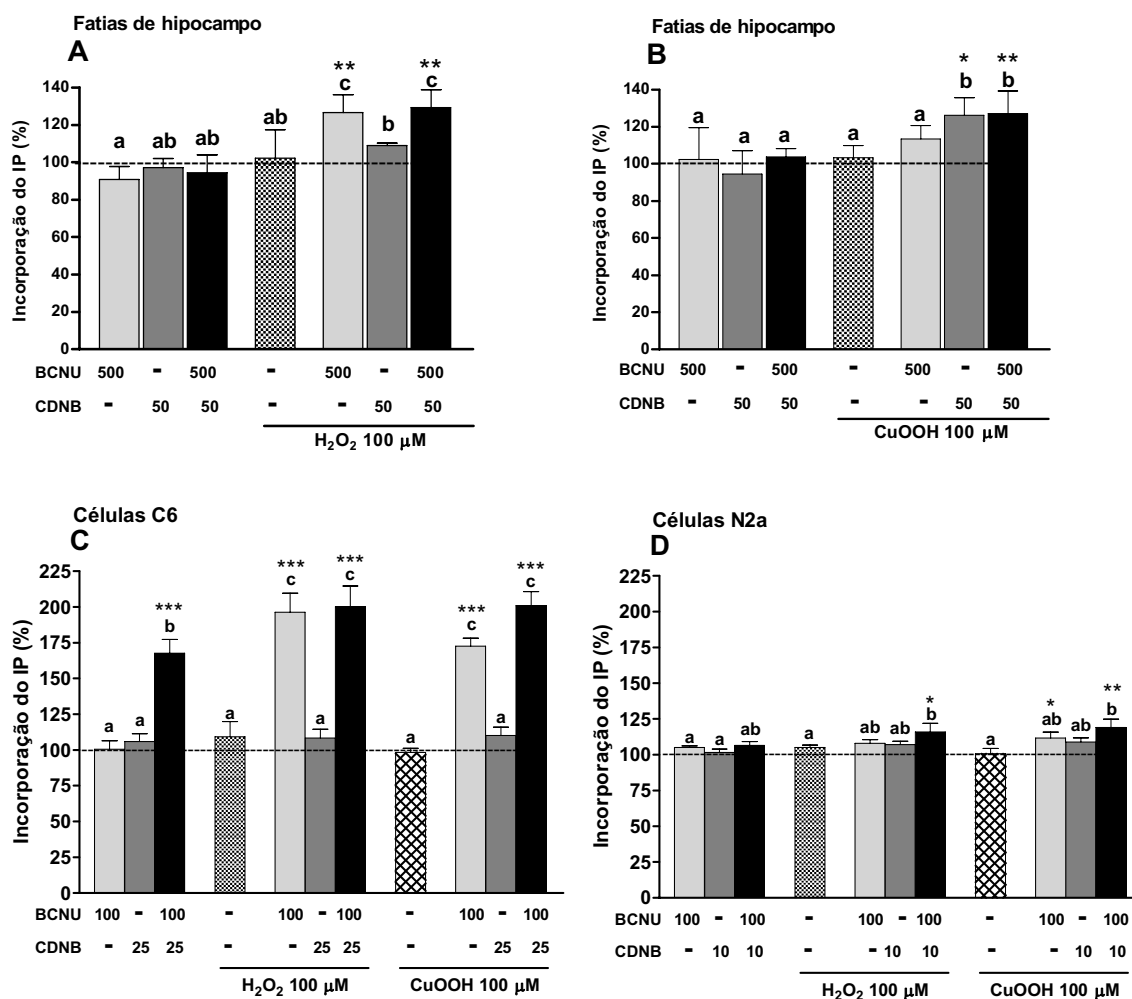


Figura 20. Permeabilidade celular em fatias de hipocampo, células C6 e células N2a tratadas com BCNU, CDNB e peróxidos. As fatias de hipocampo e as linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos com veículo, BCNU, CDNB ou com ambos, nas concentrações indicadas. Um subgrupo de cada pré-tratamento foi exposto aos peróxidos H₂O₂ ou CuOOH. Após esse período, um grupo foi incubado com hepes-salina e outro com peróxidos. Nas fatias de hipocampo tratadas com peróxido de hidrogênio (**A**) o tempo de incubação foi de 60 minutos, enquanto nas tratadas com peróxido de cumeno (**B**) o tempo foi de 90 minutos. Nas duas linhagens celulares (**C** e **D**), a incubação com peróxidos foi de 60 minutos. A permeabilidade celular foi avaliada pela incorporação do IP, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média e estão expressos em porcentagem, sendo n=3. As diferenças significativas, quando houver, entre o veículo (linha tracejada) e os tratamentos, estão representadas por *p<0,05, ** (p<0,005) e *** (p<0,001). Comparações entre os demais grupos estão representadas por letras. Grupos que não compartilham letras possuem diferenças significativas entre si (p<0,05). Após a análise da variância as médias foram comparadas com o teste *post hoc* de Duncan.

5.11. Efeito do AT sobre o índice de danos ao DNA em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio

O pré-tratamento com AT 50 mM e peróxido de hidrogênio 100 μ M, isolados ou combinados, não aumentaram o índice de danos (ID) ao DNA em fatias de hipocampo, como mostra a figura 22A.

Nas células C6, foi observado aumento do ID nos pré-tratamentos com AT 50 mM, com e sem a adição de peróxido de hidrogênio 100 μ M. O tratamento somente com AT, sem a adição de peróxido, aumentou o ID das fatias em 37,3 pontos em relação ao controle. A incubação somente com peróxido de hidrogênio 100 μ M elevou essa diferença para 86,1 pontos, enquanto que na combinação de AT e peróxido foi significativamente além de 101 pontos de ID (figura 22B).

Os índices de danos das células N2a não aumentaram após pré-tratamentos feitos com AT. Entretanto, o peróxido de hidrogênio 100 μ M, isolado ou combinado com AT, provocou marcante aumento do dano ao DNA (92,3 pontos). A combinação AT e peróxido não foi diferentes do tratamento com AT isolado, indicando que a inibição da CAT pouco contribuiu para o dano ao DNA, diferente do que ocorreu nas células C6, onde houve sinergismo entre AT e H₂O₂ (figura 22C).

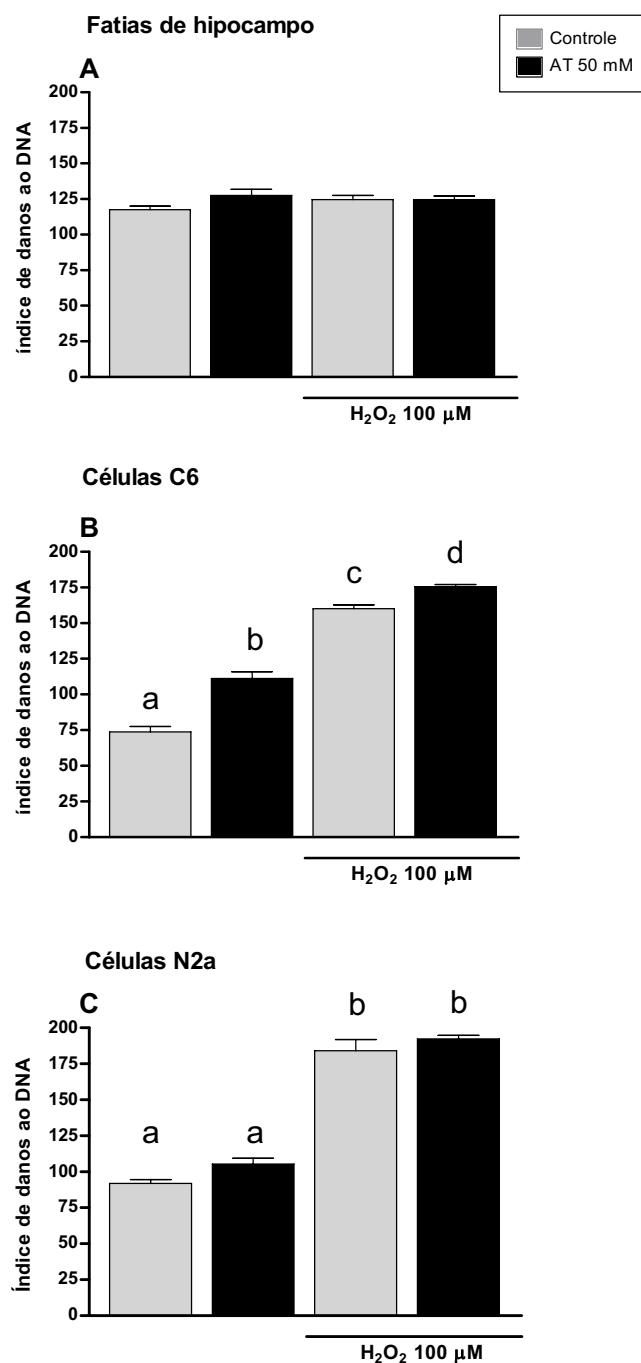


Figura 22. Índice de danos ao DNA em fatias em hipocampo e nas linhagens celulares C6 e N2a tratadas com AT 50 mM e/ou peróxido de hidrogênio. As fatias de hipocampo e as linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos no meio hepes-salina (controle) ou com AT 50 mM. Em seguida, os grupos controle e AT 50 mM, foram subdivididos incubados com com peróxido de hidrogênio 100 μM durante 60 minutos. O índice de danos ao DNA foi avaliado pelo ensaio do cometa, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam média ± erro padrão da média e estão expressos em índice de danos, sendo n=3. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos feitos nas fatias de hipocampo. Para as células C6 e N2A, os grupos que não compartilham letras possuem diferenças significativas entre si. (p<0,05). Após a análise da variância as médias foram comparadas com o teste *post hoc* de Duncan

5.12. Efeito do BCNU e do CDNB sobre o índice de danos ao DNA, pelo ensaio do cometa, em fatias de hipocampo e células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio ou de cumeno

As fatias de hipocampo pré-tratadas com BCNU (22,0 %) e a combinação BCNU+CDNB (25,4 %) tiveram aumento significativo no índice de dano em relação ao veículo. Não houve alterações nesse índice tanto nas fatias pré-tratadas com CDNB quanto naquelas que foram incubadas somente com peróxido de hidrogênio 100 μ M, como mostra a figura 20A. A adição H_2O_2 após a pré-incubação com os inibidores não modificou esta situação, exceto pelo aumento significativo de dano ao DNA no grupo BCNU+ H_2O_2 , anteriormente não observado. (figura 23A). Nos grupos tratado com CuOOH os efeitos encontrados foram similares àqueles encontrados com o tratamento com H_2O_2 , exceto pela ausência de diferenças significativas nos grupos BCNU e CuOOH + CDCB. (figura 23B).

As células C6 que receberam pré-tratamentos com BCNU, CDNB e BCNU+CDNB, tiveram aumento significativo no ID em relação ao controle. O efeito combinado dos dois inibidores foi bastante elevado, atingindo uma diferença de 88,2 pontos em relação ao grupo veículo. O ID das células C6 aumentou significativamente com a exposição ao H_2O_2 100 μ M. Esses números foram acentuados pelo pré-tratamento com os inibidores, atingindo diferença significativa não só do grupo veículo, mas também do grupo H_2O_2 . Não houve diferenças significativas desses grupos entre si, como mostra a figura 23C.

O tratamento com peróxido de cumeno isoladamente aumentou em 89,6 pontos o índice de danos das células C6, quando comparado com o veículo. O pré-tratamento com CDNB aumentou significativamente o índice de danos em relação ao grupo CuOOH, mostrando sinergismo entre o tratamento com CDNB e o dano causado pelo H_2O_2 . Este resultado não se alterou quando CDNB e BCNU foram combinados (figura 23C).

Nas células N2a, os resultados foram similares aos encontrados nas células C6, onde somente a combinação BCNU+CDNB elevou significativamente o ID para 155,3. Após a

incubação com peróxido de hidrogênio 100 μM o ID foi bastante maior do que os níveis basais e não foi alterado pelo tratamento com os inibidores (figura 23D), não havendo diferenças significativas entre estes grupos. As células N2a apresentaram aumento acentuado no ID após o tratamento com peróxido de cumeno 100 μM , similar ao efeito do H_2O_2 , enquanto que a pré-incubação com os inibidores, isoladamente ou combinados, não aumentou este dano ao DNA (figura 23D).

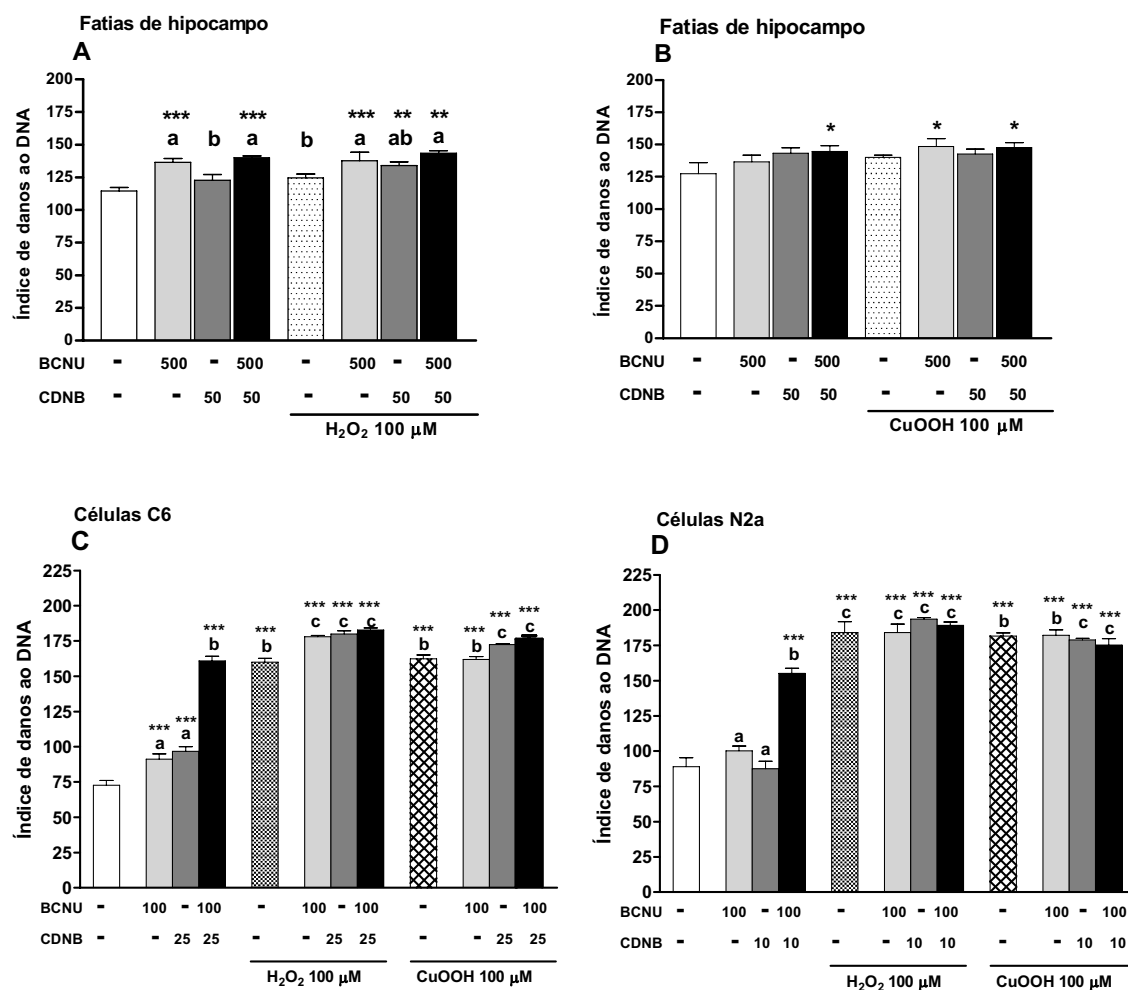


Figura 23. Índice de danos ao DNA em fatias de hipocampo e na linhagens celulares C6 e N2a tratadas com BCNU, CDBN e/ou peróxidos. As fatias de hipocampo e as linhagens celulares foram pré-tratadas por 30 minutos com veículo, BCNU, CDBN ou com ambos, nas concentrações indicadas. Após esse período, um subgrupo de cada tratamento com peróxidos. Nas fatias de hipocampo tratadas com peróxido de hidrogênio (**A**) o tempo de incubação foi de 60 minutos, enquanto nas tratadas com peróxido de cumeno (**B**) o tempo foi de 90 minutos. Nas duas linhagens celulares (**C** e **D**), a incubação com peróxidos foi de 60 minutos. O índice de danos ao DNA foi avaliado pelo ensaio do cometa, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média e estão expressos como índice de danos, sendo $n=3-4$. As diferenças significativas, quando houver, entre o veículo e os tratamentos, estão representadas por * $p<0,05$, ** $(p<0,005)$ e *** $(p<0,001)$. Comparações entre os demais grupos, estão representados por letras. Grupos que não compartilham letras possuem diferenças significativas entre si. ($p<0,05$). Após a análise da variância as médias foram comparadas com o teste *post hoc* de Duncan

5.13. Efeito do BCNU e do CDNB na oxidação e superoxidação da peroxirredoxina em células C6 e N2a expostas ao peróxido de hidrogênio.

Estudos feitos na estrutura da Prx-II revelam que a forma tiólica de suas cisteínas favorece a formação de monômeros, enquanto a formação de pontes dissulfeto inter-subunidades favorece a formação de dímeros durante o ciclo catalítico (WOOD *et al.*, 2003). Nas condições de desnaturação da imunodeteção, a Prx-II reduzida (forma tiólica) migra durante a eletroforese como uma banda monomérica simples. Como a oxidação da cisteína é frequente durante a extração, o extrato celular foi obtido na presença de NEM, bloqueando as cisteínas livres e impedindo a formação artificial de dímeros. Entretanto, fisiologicamente, quando a célula sofre um dano oxidativo, a Prx-II pode formar pontes dissulfeto intercadeias e, portanto, dímeros.

A Prx-II possui dois pares de cisteína, as quais podem formar uma ou duas pontes dissulfeto entre as duas subunidades. Nesta condição, a enzima migra como dímero na eletroforese desnaturante sem adição de agente redutor. Na sua forma superoxidada (SO₃), a Prx-II migra preferencialmente como monômero. Entretanto, já foram encontradas formas diméricas em eritrócitos tratados com agentes oxidantes (LOW *et al.*, 2007). As células C6 e N2a foram tratadas com BCNU e CDNB, isoladamente ou combinados. Para avaliar a presença da Prx-II, foi feita imunodeteção para identificar a enzima na suas formas monomérica, dimérica ou superoxidada (SO₃).

Nas células C6, o anticorpo para Prx-II identificou bandas monoméricas, normalmente como se apresentam na sua forma reduzida (figura 24A). O tratamento com os inibidores ou peróxido de hidrogênio não alterou o padrão de migração das bandas, que permaneceram como monômeros.

A forma superoxidada foi identificada com anticorpo específico para a forma Prx-SO₃. O anticorpo detectou uma fraca banda dimérica no grupo controle (veículo) e no grupo tratado com BCNU. Nos demais grupos, as intensidades das bandas diméricas aumentaram

fortemente. Uma banda com peso molecular menor que o dímero aparece em todos os tratamentos envolvendo H_2O_2 . Esta banda poderia ser originária da forma SO_3 de outras isoformas de Prx. Apesar da maior parte da Prx-II se encontrar na forma monomérica em todos os tratamentos, é possível perceber que a forma superoxidada preferencial é a forma dimérica, que aparece acentuada nos grupos contendo H_2O_2 e/ou CDNB.

Nas células N2a, o grupo não tratado (veículo) aparece como monômero em uma banda bem nítida, indicando sua forma reduzida, além de uma banda fraca que aparece como dímero. Nos grupos tratados com BCNU não foi possível detectar a Prx-II através da imunodeteção. Após os tratamentos, percebe-se que a forma dimérica aumenta significativamente (figura 25A). Diferente do encontrado nas células C6, a forma dimérica aparece predominantemente em todos os grupos tratados com H_2O_2 e/ou CDNB. Percebe-se que em todos os grupos tratados com H_2O_2 há também retorno parcial para a forma monomérica. Isto indica a formação da forma superoxidada, o que é intensificado nos grupo pré-tratados com CDNB e/ou BCNU, mostrando o sinergismo entre os a inibição da GR e da TrxR sobre o efeito do H_2O_2 .

A forma superoxidada da Prx-II em células N2a aparece fracamente na forma dimérica do grupo controle (veículo), mas é bastante acentuada por todos os tratamentos, sendo o efeito do H_2O_2 mais importante (25B). Uma fraca banda na posição entre o monômero e o dímero da Prx II pode ser observada em vários tratamentos, indicando uma banda inespecífica, ou outra isoforma de Prx- SO_3 .

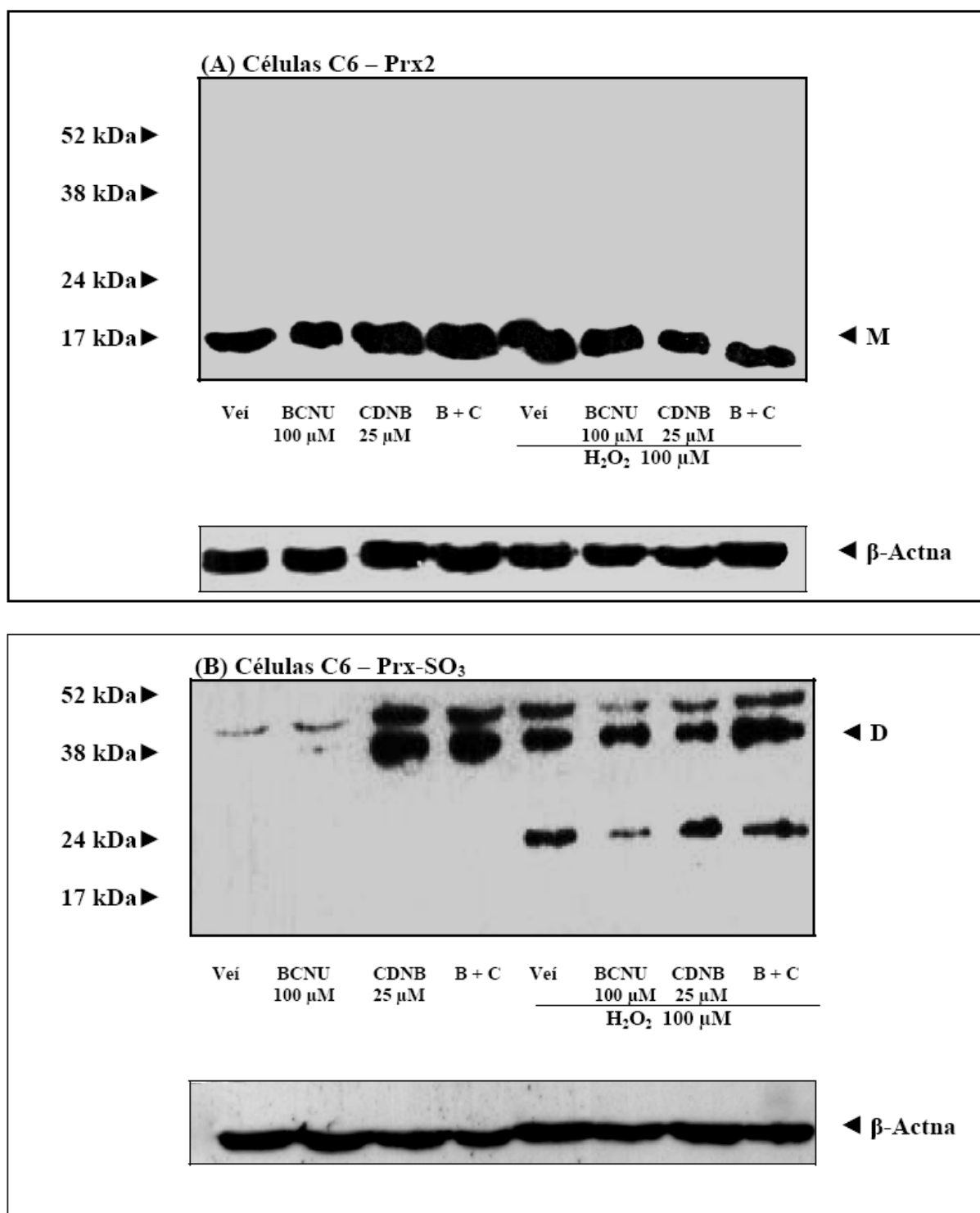


Figura 24. Efeito do BCNU e/ou do CDNB na dimerização e no aparecimento da forma superoxidada da Prx-II em células C6. As células C6 foram pré-tratadas por 30 minutos com veículo, BCNU, CDNB ou com ambos, nas concentrações indicadas. Em um grupo, após 30 minutos de pré-tratamento, o meio foi substituído por hepes-salina, enquanto em outro grupo, o meio foi substituído por peróxido de hidrogênio 100 μ M. A Prx-II (A) e sua forma superoxidada (Prx-SO₃) (B) foram identificadas utilizando-se anticorpos específicos, por imunodeteção, como descrito em materiais e métodos. A forma monomérica é indicada por M e a forma dimérica por D, além dos marcadores de peso molecular. São apresentadas imagens representativas de três experimentos independentes. A β -Actina foi utilizada como controle.

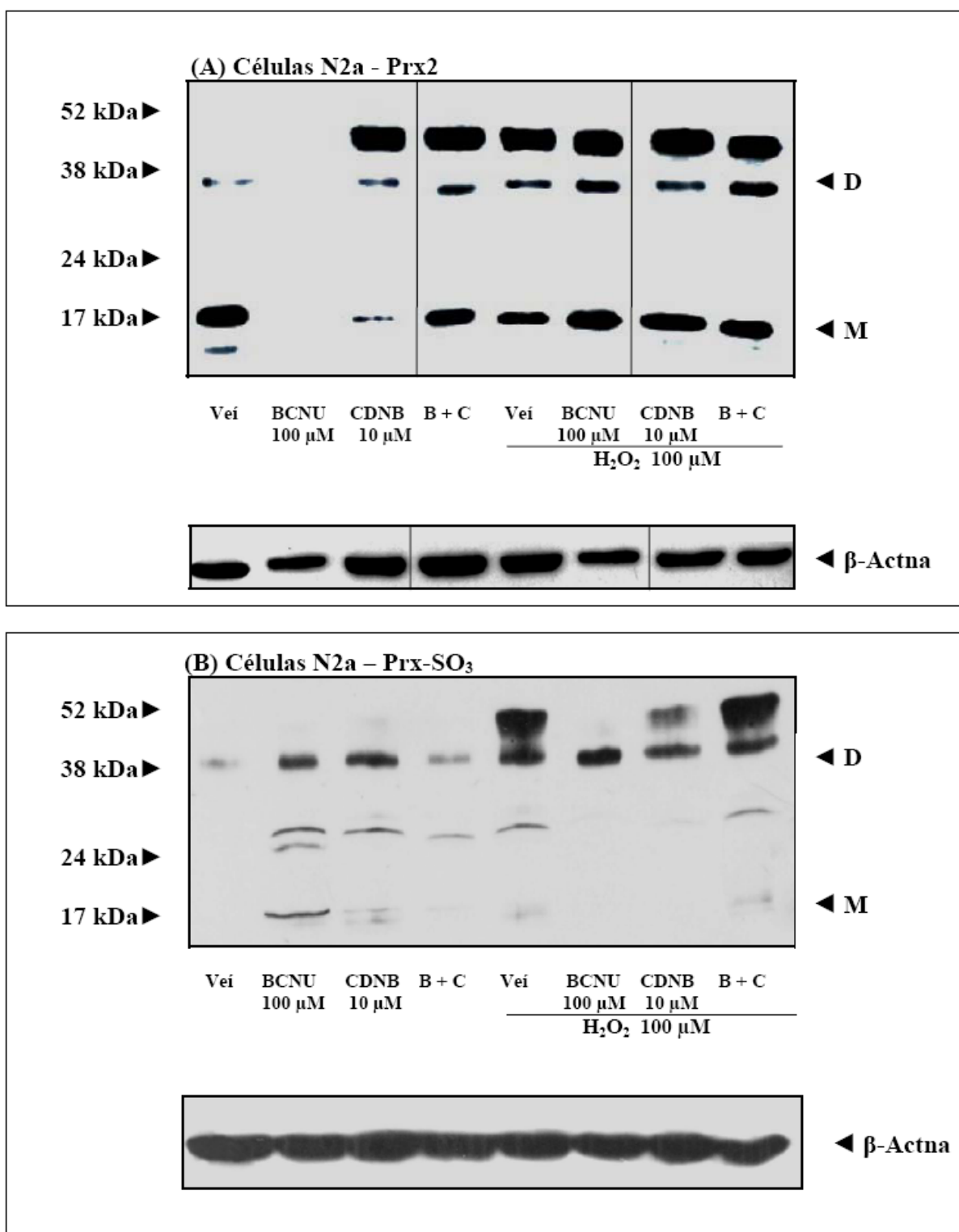


Figura 25. Efeito do BCNU e/ou CDNB na oxidação e superoxidação Prx-II em células N2a. As células N2a foram pré-tratadas por 30 minutos com veículo, BCNU, CDNB ou com ambos, nas concentrações indicadas. Em um grupo, após 30 minutos de pré-tratamento, o meio foi substituído por hepes-salina, enquanto em outro grupo, o meio foi substituído por peróxido de hidrogênio 100 µM. A Prx-II **(A)** e sua forma superoxidada (Prx-SO₃) **(B)** foram identificadas utilizando-se anticorpos específicos, por meio de imunodeteção, como descrito em materiais e métodos. A forma monomérica é indicada por **M** e a forma dimérica por **D**, além dos marcadores de peso molecular. São apresentadas imagens representativas de três experimentos independentes. Em **(A)**, as imagens apresentados são resultados de duas membranas intercaladas. A β-Actina foi utilizada como controle.

6. Discussão

Nas células, o controle do estado redox é mantido por sistemas complexos que envolvem enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e peroxirredoxina (Prx). Em relação às enzimas GPx e Prx, o ciclo catalítico se completa com o auxílio de pequenas moléculas tiólicas doadoras de elétrons, como a glutathione e a tioredoxina, respectivamente, que por sua vez são mantidas reduzidas pela glutathione redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR), às custas de NADPH.

Esses sistemas atuam na eliminação do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos produzidos durante o metabolismo celular, inclusive na mitocôndria e peroxissomas, mantendo o equilíbrio entre a produção e eliminação de peróxidos. (ARNÉR e HOLMGREM, 2000; BAUD *et al.*, 2004; RHEE *et al.*, 2003; DRINGEN *et al.*, 2005). A taxa de degradação da Prx ($10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Parsonage *et al.*, 2005; Ogusucu *et al.*, 2007; Peskin *et al.*, 2007) permite que possa competir com a GPx ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e com a CAT ($10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) na degradação de peróxidos nos sistemas biológicos (Mueller *et al.*, 1997; Deissero e Dounce, 1970).

Nesse trabalho, foram utilizados 3 modelos para o estudo da capacidade de degradação de peróxidos, onde foram avaliados diversos parâmetros relacionados à sobrevivência celular em fatias de hipocampo de ratos, culturas celulares de glioma de ratos C6 e neuroblastoma de camundongos N2a. Os efeitos da inibição da CAT, GR e TrxR, três enzimas importantes no ciclo redox celular, foram utilizados como ferramentas para perturbar as defesas antioxidantes com o objetivo de reduzir a capacidade de degradação de peróxidos.

6.1. Inibição da catalase

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a inibição da CAT pelo AT afetou significativamente a capacidade das fatias de hipocampo em degradar o H_2O_2 . As células N2a

foram fracamente afetadas e as células C6 não foram afetadas, embora uma tendência tenha sido observada. Esse decréscimo na atividade da CAT nas fatias não afetou a viabilidade celular nem a permeabilidade celular, tampouco afetou os índices de dano ao DNA. As células C6 somente tiveram aumento no dano do DNA após a inibição da CAT e subsequente exposição ao H_2O_2 , enquanto as células N2a tiveram danos no DNA e decréscimo na viabilidade, o que é compatível com a fraca redução da capacidade de eliminar H_2O_2 causado pela inibição da CAT. Outras variáveis e/ou tratamentos não foram alterados pela inibição da CAT.

Estes dados indicam que a inibição da CAT não comprometeu as fatias de hipocampo, não teve efeito nas células C6, enquanto as células N2a foram moderadamente afetadas. A partir destes dados podemos inferir que em todos os 3 modelos a degradação de H_2O_2 é funcionalmente realizada por mais de um sistema antioxidante. Estes dados permitem uma inferência alternativa, na qual outros sistemas conseguem compensar o decréscimo parcial da atividade CAT. Entretanto, nas células N2a há maior dependência da atividade CAT. Esta dependência pode ser devida à grande importância da CAT ou estas células estão enfrentando maior estresse oxidativo nas condições de cultivo e a falta parcial de qualquer sistema antioxidante afeta a função celular (SOKOLOVA *et al.*, 2001; DRINGEN *et al.*, 2005).

Estudos realizados com astrócitos, oligodendrócitos, microglia e neurônios demonstraram que as células do sistema nervoso se comportam de forma diferente quando degradam H_2O_2 . Oligodendrócitos em cultura degradam com maior eficiência o H_2O_2 do que astrócitos, microglia e neurônios (HIRRLINGER *et al.*, 2002). Nossos resultados mostraram que as células N2a, que possuem características de neurônios, degradaram com menos eficiência o H_2O_2 .

A importância da CAT para a eliminação de H_2O_2 em neurônios foi demonstrada com a utilização de culturas celulares por Dringen e colaboradores (2005), onde o AT reduziu de forma mais eficiente a capacidade dos neurônios de degradar H_2O_2 , diferente das células

astrogliais, onde essa inibição não afetou os níveis de degradação de peróxido, em concordância com os dados descritos em Resultados. Para aqueles autores, a CAT é essencial para a eliminação de H_2O_2 nos neurônios e que essas células são mais vulneráveis ao estresse oxidativo. Neste sentido, os dados obtidos também corroboram aqueles obtidos por Dringen e colaboradores (2005). Adicionalmente, nossos dados demonstram que fatias de hipocampo são pouco dependentes da ação da CAT.

Utilizando um modelo matemático para estudar a cinética de degradação de H_2O_2 por astrócitos e células C6, Makino e colaboradores (2008) encontraram níveis mais altos de CAT nesses dois tipos celulares, quando comparados a linhagens de células PC12, de tumores de medula adrenal de rato, e HUVEC, de endotélio. Células como oligodendrócitos, que possuem grande capacidade de degradação de H_2O_2 , da mesma forma como os astrócitos, podem participar da proteção de neurônios e células vizinhas contra o estresse oxidativo (DRINGEN e HAMPRECHT, 1996; HIRRLINGER *et al.*, 2002). Entretanto nossos dados apontam que a redução parcial desta atividade CAT não foi suficiente para comprometer os parâmetros de viabilidade celular em fatias de hipocampo e provocou apenas um pequeno aumento nos danos ao DNA nas células C6 e N2a, indicando que o nível basal da atividade CAT é pouco relevante nas condições experimentais empregadas.

Em culturas primárias de astrócitos, a atividade da CAT é rapidamente perdida quando há inibição da GPx, sugerindo que o ciclo redox da glutathiona é essencial para impedir a auto-inativação da CAT e que o seu comprometimento enfraquece o sistema de defesa antioxidante celular contra a toxicidade do H_2O_2 . Por outro lado, a perda da função da CAT pode ser compensada pelo sistema da glutathiona (SOKOLOVA *et al.*, 2001). Baud e colaboradores (2004) encontraram dependência de GPx para o funcionamento CAT na degradação de H_2O_2 em oligodendrócitos. Recente trabalho mostrou que a perda da atividade Prx leva ao comprometimento da atividade GPx (CHO *et al.*, 2010).

Todos estes dados apontam para uma interligação entre os sistemas de degradação de peróxidos, que poderia ser entendido como uma maneira coordenada de sinalizar para a indução de respostas adaptativas, como tem sido observado em inúmeras espécies, de seres unicelulares, como protozoários, a organismos mais complexos, como mamíferos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VEAL *et al*, 2007; WINTERBOURN e HAMPTON, 2008).

6.2. Inibição da glutathione redutase (GR)

A GPx é uma enzima capaz de degradar peróxidos orgânicos e inorgânicos e sua ação é dependente do ciclo redox da glutathione. A reciclagem da glutathione oxidada, formada durante a ação enzimática da GPx, é feita pela GR, numa reação dependente de NADPH (SCHAFER e BUETTNER, 2001; MAULIK e DAS, 2008). BCNU é um composto eletrofílico com alta afinidade por grupos sulfidrilas que inibe especificamente a GR (WHITE *et al.*, 1999; TRETTER *et al.*, 2003). Desta forma, a função da GPx estaria comprometida, limitando a capacidade de degradação de peróxidos nos 3 modelos estudados. Como demonstrado em Resultados, a capacidade de degradação de peróxidos orgânicos foi especialmente afetada pela inibição da GR por BCNU, enquanto que a degradação de H₂O₂ foi bem menos afetada, apesar de significativa, em 2 modelos celulares estudados.

Trabalho anterior mostrou que o pré-tratamento com BCNU não alterou a função mitocondrial de fatias de hipocampo sem a adição de peróxidos (BAHL, 2007). Entretanto, a sensibilidade das culturas celulares ao BCNU tem sido demonstrada por diversos autores em que o MTT foi utilizado para medir a viabilidade celular, mas com tempos de incubação, concentrações e meios de cultura diferentes dos utilizados neste trabalho (YANG *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2008; SPASOJEVIC *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram várias diferenças entre as fatias de hipocampo, células C6 e N2a. De modo geral, a inibição da GR afetou a viabilidade celular, a

permeabilidade celular e aumentou os danos no DNA, ainda que com certa heterogeneidade entre os efeitos do H_2O_2 e do CuOOH , tanto em fatias de hipocampo como nas células C6 e N2a. Em alguns casos (viabilidade celular em fatias e células C6; danos ao DNA em fatias e células C6) apenas a inibição da GR pelo BCNU, sem adição de peróxido, já produziu um efeito negativo nos parâmetros analisados.

Após a inibição da GR, tanto fatias de hipocampo quanto células C6 e N2a apresentaram sinergismo quando expostas aos peróxidos, ou seja, o comprometimento da atividade da GPx potencializou os danos oxidativos do H_2O_2 . Nestes casos, todos os parâmetros foram afetados negativamente. Apenas a permeabilidade celular e os danos ao DNA, ora foi potencializado pelo H_2O_2 , ora pelo CuOOH , ora por ambos, dependendo se fatias de hipocampo, células C6 ou N2a estavam sendo estudadas. Estes dados claramente caracterizam a importância da GPx na proteção tanto contra a perda da viabilidade celular e aumento da permeabilidade celular, quanto contra os danos ao DNA causado pelo H_2O_2 e/ou CuOOH . A dependência da reciclagem de GSSG para GSH pela GR também fica claramente demonstrada. Os testes mostraram danos agudos, entre 60 e 90 minutos, mas poderiam resultar em consequências tardias diversas, se o tempo de cultivo fosse estendido para 24 ou 48 horas. Neste caso, seria possível observar o aparecimento de apoptose ou respostas de defesas celulares, entre outros fenômenos mais tardios.

A atividade anti-tumoral do BCNU está relacionada à sua grande capacidade de alquilação. Além de inibir a GR, também suprime a atividade de várias enzimas de reparo do DNA, como a DNA ligase e a DNA polimerase (PETÁK *et al.*, 1998; CHAN e ALI-OSMAN, 1998). Entretanto, o BCNU isoladamente nem sempre aumentou os danos ao DNA. Aparentemente é necessário que o sistema de degradação de peróxidos esteja comprometido, no nosso caso, aqueles dependentes da GPx e da Prx, para que os danos ao DNA possam ser observados em situações basais. Já com o tratamento com peróxidos, o dano foi bastante acentuado, independente da presença de inibidores, os quais potencializaram levemente o

efeito dos peróxidos. O BCNU causou um elevado aumento na permeabilidade celular nas células C6, mas não em fatias de hipocampo e células N2a, indicando que um dos principais meios de morte celular nas células C6 é por necrose.

6.3. Inibição da tioredoxina redutase (TrxR)

A Prx degrada, como a GPx, peróxidos orgânicos e inorgânicos e sua forma oxidada é regenerada pela Trx, também as custas de NADPH, que é utilizado pela TRxR para regenerar a Trx oxidada (ARNÉR e HOLMGREN, 2000). O CDNB é um composto eletrofílico que alquila grupos sulfidrilas e inibe seletivamente e irreversivelmente a TrxR em concentrações muito inferiores às necessárias para transformar outros grupos tióis, como a glutatona, por exemplo (ARNÉR *et al.*, 1995; SEYFRIED e WÜLLNER, 2007). Com este tratamento, as células têm uma capacidade reduzida de reciclar a Prx, o que facilita o acúmulo da sua forma inativa (dimérica ou superoxidada) durante o ciclo catalítico (PESKIN *et al.*, 2007; LOW *et al.*, 2007).

O pré-tratamento com CDNB reduziu em 20-30 % a capacidade de degradação do H_2O_2 , tanto nas fatias de hipocampo como nas linhagens celulares, mas somente em alguns dos tempos estudados, indicando que este não é o principal mecanismo de degradação de H_2O_2 . A degradação de CuOOH foi mais afetada, tanto em fatias de hipocampo como nas células C6 e N2a, ao ponto de o consumo de CuOOH ter sido completamente abolido pelo pré-tratamento com CDNB nas células C6.

O comprometimento da capacidade de degradação de peróxidos pelo CDNB reduziu a viabilidade nos três sistemas celulares estudados após adição de peróxidos. No entanto, somente a presença de CDNB foi suficiente para reduzir a viabilidade e aumentar o dano ao DNA nas células C6. O dano ao DNA causado pelos peróxidos foi potencializado pela inibição da TrxR nas fatias e nas linhagens celulares. A permeabilidade celular foi aumentada somente em fatias de hipocampo tratadas com CuOOH. Um aumento no dano ao DNA foi

observado nos 3 sistemas. Tanto quanto o comprometimento do sistema GPx/GR/GSH, o comprometimento do sistema Prx/TrxR/Trx claramente potencializou os efeitos negativos de H_2O_2 e CuOOH, demonstrando a importância do sistema de degradação de peróxidos dependentes de Prx.

A partir da comparação dos prejuízos causados pela inibição da GR ou da Trx, foi possível entender que as células C6 são muito mais sensíveis à inibição de uma destas enzimas do que fatias de hipocampo ou células N2a, uma vez que somente o tratamento com BCNU ou com CDNB foi suficiente para diminuir a viabilidade celular e induzir danos ao DNA. Os experimentos não permitiram discriminar um sistema mais eficiente na degradação de H_2O_2 ou CuOOH, mais reforçou a maior importância das enzimas GPx e Prx, em comparação com a CAT. Em geral os efeitos do pré-tratamento com CDNB não foram aparentes ou foram menores do que os efeitos do BCNU, indicando que o sistema da GPx pode ter preponderância sobre o sistema da Prx, apesar de que ficou clara a importância do sistema da Prx.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o CuOOH pode induzir peroxidação lipídica e estresse oxidativo no hipocampo (BOULUS *et al.*, 2007; DUCLOT *et al.*, 2010) e em células C6 (ZIELINSKA *et al.*, 2006; LINDEN *et al.*, 2008; RÜWELER *et al.*, 2009). Os inibidores da GR e TrxR nem sempre foram eficientes em reduzir a viabilidade, a permeabilidade celular ou os danos ao DNA nas fatias de hipocampo de ratos ou nas linhagens das células C6 e N2a. A subsequente adição de peróxidos de hidrogênio ou cumeno 100 μ M aumentou consideravelmente os efeitos dos inibidores nos diversos parâmetros avaliados. Isso deve ter ocorrido porque o CuOOH pode induzir estresse oxidativo, também evidenciado pelo teste do cometa (ONARAN *et al.*, 2006). Devido à sua característica lipofílica, o CuOOH é capaz de induzir danos às membranas celulares (ZIELINSKA *et al.*, 2006). O H_2O_2 também pode causar danos, como ocorreu em hipocampo de camundongos e

células N2a, onde induziu a liberação de cálcio por meio da ativação de receptores NMDA, situação que aumentou o estresse oxidativo e a morte celular. (KEMMERLING *et al.*, 2007).

Outro aspecto relacionado à indução de danos pelo H_2O_2 é que ele favorece a oxidação das proteínas dos canais de sódio pela ativação de PKC (proteínas cinase C), interferindo no fluxo de Na^+ na célula, aumentando sua concentração intracelular e causando danos aos neurônios do hipocampo pela ativação de proteases, fosfolipases endonucleases (MENG e NIE, 2004).

6.4. Inibição simultânea da GR e da TrxR

A inibição parcial de qualquer das duas enzimas (GR ou TrxR) é suficiente para reduzir a capacidade de degradação de H_2O_2 , mas estranhamente não houve sinergismo entre os tratamentos, ou seja, o decréscimo na capacidade de degradar peróxidos só foi ligeiramente intensificado aos 60 minutos em fatias de hipocampo. Entretanto, a inibição simultânea da GR e da TrxR comprometeu a viabilidade celular em fatias de hipocampo e células N2a, aumentou na permeabilidade nas células C6 e N2a e causou danos ao DNA nos três modelos estudados. Esses resultados corroboram os dados obtidos com o pré-tratamento isoladamente com um dos inibidores, ou seja, ambos os sistemas parecem bastante relevantes na proteção contra danos agudos causados por H_2O_2 ou $CuOOH$.

Tanto as fatias quanto as células C6 e N2a degradaram $CuOOH$ com velocidade em torno de 50% menor do que H_2O_2 . Dringen e colaboradores (2005) também encontraram taxa menos de degradação de peróxidos orgânicos em culturas de neurônios. No cérebro, a eliminação de H_2O_2 e de peróxidos orgânicos tem sido atribuída primariamente à GPx (TRETTER *et al.*, 2003; DRINGEN *et al.*, 2005) e mais recentemente também a Prx, enzima que tem sido associada a mecanismos de proteção contra danos oxidativos (RHEE *et al.*, 2003; SHUVAEVA *et al.*, 2009). Os resultados obtidos com os tratamentos mostraram que o comprometimento dos sistemas de regeneração da GPx e da Trx atuam conjuntamente, pois

em diversas situações a presença de BCNU ou de CDNB isoladamente não foi suficiente para comprometer a função celular. No entanto, a inibição de ambos os sistemas ao mesmo tempo aumentaram os danos celulares.

Diversos trabalhos têm sido feitos em relação à importância das enzimas GPx e Prx no metabolismo celular. Furling e colaboradores (2000) demonstraram que o aumento moderado na atividade da GPx preveniu danos funcionais irreversíveis produzidos por hipóxia transitória em fatias de hipocampo de camundongos, além de ajudar a manter os mecanismos eletrofisiológicos básicos envolvidos na formação da memória.

Efeitos de xenobióticos como o cádmio e o metilmercúrio afetam a atividade da GPx no sistema nervoso. Em trabalho realizado com cérebro de coelho, foi demonstrado que o cádmio inibe a GPx, aumentando os níveis de estresse oxidativo (ULUSU *et al.*, 2003). Em trabalho realizado com cérebro e mitocôndrias isoladas de camundongos e com células SH-SY5Y (neuroblastoma humano), Franco e colaboradores (2009) demonstraram que o metilmercúrio reduziu a atividade da GPx, e que esta atividade foi essencial para a proteção celular, sugerindo que a GPx pode ser a principal defesa contra a neurotoxicidade induzida por este agente.

A importância da Prx na proteção contra danos oxidativos também têm sido demonstrada em diversos trabalhos. Estudos feitos em hipocampo de camundongos mostraram que a deficiência na Prx-II causou danos oxidativos na mitocôndria, comprometeu a plasticidade sináptica no hipocampo e causou declínio na aprendizagem e memória. Esses danos foram amenizados com a administração de vitamina E, sugerindo que a Prx-II está relacionada aos mecanismos de defesa antioxidantes de neurônios (KIM *et al.*, 2009). Em estudos *in vitro* feitos com diversas linhagens de gliomas, Smith-Pearson e colaboradores (2008) encontraram maior expressão da Prx-II após exposição à radiação ionizante e ao H₂O₂. O estresse oxidativo causado pelos tratamentos foi evidenciado pela observação do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, declínio da GSH e aumento da oxidação da Prx-II.

Em estudo *post mortem* com pacientes acometidos com o mal de Alzheimer, Power e colaboradores (2008) mapearam o cérebro humano em relação à presença da Prx-VI e verificaram que esta enzima é encontrada em maior quantidade nos astrócitos, com níveis mais baixos nos neurônios e não detectada na micróglia e oligodendrócitos. Eles encontraram maior expressão dessa enzima em pacientes com Alzheimer. Os autores acreditam que há envolvimento da Prx-VI na eliminação de placas difusas que aparecem no cérebro desses pacientes e sugeriram que ela seja a enzima antioxidante mais importante no sistema nervoso humano.

Os modelos empregados em nosso estudo (fatias de hipocampo, células C6 ou N2a) demonstraram cooperação entre os dois sistemas (GPx e Prx), mas sem um papel tão preponderante da CAT, diferente de estudos que já indicaram a CAT como principal sistema de degradação de peróxidos (GAETANI *et al.*, 1996; MUELLER *et al.*, 1997). A quase completa perda da capacidade de degradação de peróxidos orgânicos pela simples inibição parcial da GR ou da TrxR, além da falta de sinergismo entre os tratamentos, mais uma vez corrobora a idéia de uma co-dependência entre os sistemas de degradação de peróxidos, como apontado anteriormente (CHO *et al.*, 2010).

Estudos com neurônios cerebelares feitos por Valencia e Morán (2004) mostraram que, dependendo do tipo da espécie reativa de oxigênio, dois diferentes mecanismos de morte celular podem estar envolvidos: apoptose ou necrose. Entretanto, no nosso modelo experimental as células foram tratadas por 60-90 minutos, período em que as respostas mais tardias ainda não se manifestam, tais como a apoptose. Desta forma, o modelo agudo empregado permite que a célula utilize o repertório de defesas celulares disponível no momento, ou que sejam ativadas em questão de minutos.

6.5. Dimerização e superoxidação da Prx-II.

A Prx-II é do tipo 2-Cys, encontrada na forma de homodímeros ligados não-covalentes com dois sítios ativos. A sua oxidação, com a formação do ácido sulfênico (Cys-SOH), pode ser regenerada pela Trx (WOOD *et al.*, 2003). Quando ocorre superoxidação, com a formação do ácido sulfínico (Cys-SO₂H) ou ácido sulfônico (Cys-SO₃H), a enzima não pode ser reciclada pela Trx, tornando-se cataliticamente inativa (YANG *et al.*, 2002). Nessa conformação, a Prx somente pode ser reduzida pela sulfiredoxina de uma maneira bastante lenta, atividade não encontrada em todos os tecidos (BITEAU *et al.*, 2003).

Durante o ciclo catalítico da Prx-II há formação de um homodímero através de pontes dissulfeto entre a cisteína peroxidática e a catalítica, de subunidades diferentes. Dímero também é uma forma inativa da Prx, que pode ser rapidamente reduzido a monômero, ativando a enzima. Isto acontece em presença de alta atividade de reciclagem Trx/TrxR, que impede o acúmulo de dímeros (LOW *et al.*, 2007). Entretanto, quando o sistema de regeneração Trx/TrxR é mais lento que a taxa de reação da Prx, há acúmulo de dímeros, como no caso de eritrócitos humanos (LOW *et al.*, 2007) ou no caso da inibição da TrxR (COX *et al.*, 2008), ou como observado neste trabalho.

Na posição de aproximadamente 24 KDa aparece uma forma superoxidada tanto para células C6 como para N2a, provavelmente proveniente de outra peroxiredoxina que não a Prx-II, uma vez que esta aparece em torno de 17-19 KDa, concordando com os dados obtidos por outros autores (PESKIN *et al.*, 2007; LOW *et al.*, 2007). As Prx-I e a Prx-II demonstraram ser mais resistentes à dimerização nas células Jukart, em comparação a Prx-III (LOW *et al.*, 2007; COX *et al.*, 2008). Neste caso os autores atribuem papel regulatório também para a Prx-III, que é mitocondrial (COX *et al.*, 2008).

Apesar de a Prx-II se expressar com mais intensidade nos neurônios do que nas células gliais (SARAFIAN *et al.*, 1999), Smith-Pearson e colaboradores (2008) também encontraram esta enzima nas células C6 em concentração quatro vezes maior do que a encontrada em

linhagens de gliomas de ratos e cinco vez maior do que em células gliais SVGP12 (originárias fetos humanos). Nossos dados de imunodeteção também indicam que há maior quantidade de Prx-II nas células C6 do que nas células N2a, uma vez que a mesma quantidade de proteína foi aplicada no gel e a intensidade das bandas foi muito maior nas células C6.

Nos resultados encontrados, as células C6, apesar da inibição da TrxR com CDNB ou da GR com CDNB, a Prx-II foi encontrada somente na sua forma reduzida, evidenciada por banda monomérica. Estes dados indicam que mesmo com atividade TrxR parcialmente comprometida, há capacidade de reciclagem suficiente para manter a enzima no estado ativo e monomérico. Apesar deste fato, estas células mostraram nítido acúmulo da forma superoxidada, especialmente com o pré-tratamento com CDNB, tratamento com H_2O_2 , ou ambos. Isto indica que há inativação da enzima, apesar de aparentemente ser uma fração pequena do total.

Nas células N2a, o tratamento com CDNB isolado ou combinado com o BCNU aumentou a forma dimérica, indicando o comprometimento da reciclagem via Trx/TrxR. A forma monomérica voltou a acumular na presença de H_2O_2 , ou H_2O_2 após o pré-tratamento com os inibidores, indicando que a enzima passou à forma superoxidada com o aumento do estresse oxidativo. O acúmulo da forma monomérica superoxidada foi acentuado pela pré-incubação com os inibidores. Estes dados estão de acordo com o esperado e em concordância com trabalhos anteriores (LOW *et al.*, 2007) com células jukart tratadas H_2O_2 , onde a Prx-II apareceu somente na forma monomérica, indicando reciclagem constante da forma oxidada. Entretanto, em eritrócitos, a forma Prx II-SO₃ foi encontrada na forma dimérica. Assim, as células N2a parecem se assemelhar mais aos eritrócitos, com baixa atividade de reciclagem via Trx/TrxR, enquanto a célula C6 parecem se assemelhar mais às células Jurkat, com alta atividade da TrxR (LOW *et al.*, 2007), o que precisa de confirmação.

Exposição a períodos menores e a baixas concentrações de H_2O_2 nem sempre causa oxidação ou superoxidação das peroxirredoxinas, como tem demonstrado alguns trabalhos

feitos anteriormente utilizando diversos tipos celulares (MITSUMOTO *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2002). Baty e colaboradores (2005) também não encontraram superoxidação da Prx-II nas células Jukart somente com o tratamento com CDNB, a semelhança dos encontrados neste trabalho. Os autores também observaram superoxidação da Prx-II com a utilização de H₂O₂, isolado ou combinado com CDNB.

7. Conclusões

1. As fatias de hipocampo e as células C6 e N2a degradaram com o dobro da eficiência o H_2O_2 , em comparação ao CuOOH .
2. O tratamento com AT, inibidor da CAT, reduziu fracamente o consumo de peróxidos, comprometeu viabilidade celular (N2a) e causou danos ao DNA (C6 e N2a), enquanto as fatias de hipocampo, apesar da redução do consumo de peróxido de hidrogênio, não apresentaram alterações nesses parâmetros.
3. Os tratamentos com BCNU ou CDNB, inibidores da GR e da PrxR, respectivamente, reduziram o consumo de peróxidos, especialmente CuOOH , nas fatias de hipocampo e células C6 e N2a.
4. O pré-tratamento com BCNU afetou mais claramente as fatias de hipocampo e as células C6, enquanto o CDNB afetou mais as células N2a.
5. Estes pré-tratamentos aumentaram os efeitos de ambos os peróxidos em reduzir a viabilidade celular e causar danos ao DNA nos três modelos estudados, enquanto o BCNU foi mais eficiente no decréscimo da viabilidade celular.
6. Os ensaios com imunodeteção mostraram que a Prx-II nas células C6 possui alta taxa de reciclagem pela TrxR, evidenciada pela presença de monômeros (forma ativa), independente do tratamento. No entanto, os resultados mostraram que essa enzima é superoxidada pelo peróxido de hidrogênio, isolado ou após pré-tratamento com os inibidores.
7. A presença de bandas monoméricas reduzidas e diméricas oxidadas e inativas da Prx-II nas células N2a, demonstraram que essas células não conseguiram manter a enzima totalmente reduzida quando exposta aos inibidores ou ao estresse oxidativo através do uso de peróxidos. A utilização do H_2O_2 , além de acentuar a oxidação, evidenciou bandas superoxidadas nestas células.

8. A CAT aparentemente teve menor relevância do que a GPx e a Prx nas condições experimentais deste trabalho. Os efeitos da inibição da GR, comprometendo a reciclagem da GPx, parece ter relevância levemente maior que a inibição do sistema da Prx.
9. A GPx e a Prx parecem ser co-dependentes e atuam conjuntamente, reforçando a idéia de que são os principais sistemas de defesa contra peróxidos em fatias de hipocampo de ratos e células C6 e N2a.

8. Referências bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-6, 1984.
- AMAZZAL, L., LAPÔTRE, A., QUIGNON, F. e BAGREL, D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. *Neuroscience Letters.* **418**: 159-164, 2007.
- ARNÉR, E. S. J., BJÖRNSTEDT, M. e HOLMGREN, A. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene Is an Irreversible Inhibitor of Human Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Chem.* **270**: 3479-3482, 1995.
- ARNÉR, E. S. J., ZHONG, L. e HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology.* **300**: 226-239, 1999.
- ARNÉR, E. S. J. e HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry.* **267**: 6102-6109, 2000.
- ARNÉR, E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases -- Important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* **1790**: 495-526, 2009.
- ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **57**: 1825-1835, 2000.
- BAHL, M. M. *Avaliação do potencial neuroprotetor do zinco e da quercetina em modelos de isquemia e estresse oxidativo.* (Dissertação de Mestrado). Departamento de Ciências Fisiológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2007. 104 p.
- BATY, J. W., HAMPTON, M. B. e WINTERBOURN, C. C. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochem J.* 2005 **389**: 785-795, 2005.
- BAUD, O., GREENE, A. E., LI, J., WANG, H., VOLPE, J. J. e ROSENBERG, P. A. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience.* **24**: 1540-1531, 2004.
- BENDA, P., LIGHTABODY, J., SATO, G., LEVINE, L. e SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**: 370-371, 1968.
- BIAGLOW, J. E. e MILLER, R. A. . The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy.* **4**: 6-13, 2005.
- BITEAU, B., LABARRE, J. e TOLEDANO, M. B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature.* **425**: 980-984, 2003.
- BOONSTRA, J. e POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene.* **337**: 1-13, 2004.
- BOULOS, S., MELONI, B. P., ARTHUR, P. G., MAJDA, B., BOJARSKI, C. e KNUCKEY, N. W. Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated

ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury. *Neurobiology of Disease*. **25**: 54-64, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**: 248-254, 1976.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biological Chemistry*. **387**: 1329-1335, 2006.

BRONISZ, A., GAJKOWSKA, B. e DOMANSKA-JANIK, K. PKC and Raf-1 inhibition-related apoptotic signalling in N2a cells. *Journal of Neurochemistry*. **81**: 1176-1184, 2002.

BUTLER, M. P., MOYNAGH, P. N. e O'CONNOR, J. J. Methods of detection of the transcription factor NF-[kappa]B in rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience Methods*. **119**: 185-190, 2002.

CARLBERG, I. e MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. **113**: 484-490, 1985.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **38**: 1482-1495, 2006.

CHAN, J. e ALI-OSMAN, F. In vitro repair synthesis of BCNU-induced DNA damage. *Cancer Biochem Biophys*. **3**: 273-286, 1998.

CHEN, X., LIANG, H., VAN REMMEN, H., VIJG, J. e RICHARDSON, A. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **422**: 197-210, 2004.

CHO, C.-S., LEE, S., LEE, G. T., WOO, H. A., CHOI, E.-J. e RHEE, S. G. Irreversible Inactivation of Glutathione Peroxidase 1 and Reversible Inactivation of Peroxiredoxin II by H₂O₂ in Red Blood Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*. **12**: 1235-1246, 2010.

CHONG, Z. Z., LI, F. e MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*. **75**: 207-246, 2005.

COHEN, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. *European Journal of Biochemistry*. **268**: 5001-5010, 2001.

CORDOVA, F. M., RODRIGUES, A. L. S., GIACOMELLI, M. B. O., OLIVEIRA, C. S., POSSER, T., DUNKLEY, P. R. e LEAL, R. B. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Research*. **998**: 65-72, 2004.

COX, A. G., BROWN, K. K., ARNER, E. S. J. e HAMPTON, M. B. The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. *Biochemical Pharmacology*. **76**: 1097-1109, 2008.

CUMMING, R. C., DARGUSCH, R., FISCHER, W. H. e SCHUBERT, D. Increase in Expression Levels and Resistance to Sulfhydryl Oxidation of Peroxiredoxin Isoforms in Amyloid beta-Resistant Nerve Cells. *J. Biol. Chem*. **282**: 30523-30534, 2007.

- DEISSERO, A. e DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev.* **50**: 319-375, 1970.
- DRINGEN, R. e HAMPRECHT, B. Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J. Neurochem.* **67**: 1375-1382, 1996.
- DRINGEN, R., KUSSMAUL, L. e HAMPRECHT, B. Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Research Protocols.* **2**: 223-228, 1998.
- DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology.* **62**: 649-671, 2000.
- DRINGEN, R., PAWLOWSKI, P. G. e HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research.* **79**: 157-165, 2005.
- DUCLOT, F., MEFFRE, J., JACQUET, C., GONGORA, C. e MAURICE, T. Mice knock out for the histone acetyltransferase p300/CREB binding protein-associated factor develop a resistance to amyloid toxicity. *Neuroscience.* **167**: 850-863, 2010.
- ERMILOVA, I. P., ERMILOV, V. B., LEVY, M., HO, E., PEREIRA, C. e BECKMAN, J. S. Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. *Neuroscience Letters.* **379**: 42-46, 2005.
- FEENEY, C. J., FRANTSEVA, M. V., CARLEN, P. L., PENNEFATHER, P. S., SHULYAKOVA, N., SHNIFFER, C. e MILLS, L. R. Vulnerability of glial cells to hydrogen peroxide in cultured hippocampal slices. *Brain Research.* **1198**: 1-15, 2008.
- FIGUEIREDO, C. P. *Avaliação da expressão do receptor do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) em modelos experimentais de doenças neurológicas.* (Tese de Doutorado). Departamento de Clínica Médica, Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina-SC, Florianópolis, 2009. 162 p.
- FINDLAY, V. J., TAPIERO, H. e TOWNSEND, D. M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **59**: 374-379, 2005.
- FISCHER, S., WIESNET, M., RENZ, D. e SCHAPER, W. H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *European Journal of Cell Biology.* **84**: 687-697, 2005.
- FLOHÉ, L. e HARRIS, J. R. *Peroxisomes: Structures and Functions* Springer., v.44. 2007. 407 p.
- FOLEY, T. D., ARMSTRONG, J. J. e KUPCHAK, B. R. Identification and H₂O₂ sensitivity of the major constitutive MAPK phosphatase from rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **315**: 568-574, 2004.
- FRANCO, J. L., POSSER, T., DUNKLEY, P. R., DICKSON, P. W., MATTOS, J. J., MARTINS, R., BAINY, A. C. D., MARQUES, M. R., DAFRE, A. L. e FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine.* **47**: 449-457, 2009.

FREITAS, R. M., NASCIMENTO, V. S., VASCONCELOS, S. M. M., SOUSA, F. C. F., VIANA, G. S. B. e FONTELES, M. M. F. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neuroscience Letters*. **365**: 102-105, 2004.

FURLING, D., GHRIBI, O., LAHSAINI, A., MIRAULT, M.-E. e MASSICOTTE, G. Impairment of synaptic transmission by transient hypoxia in hippocampal slices: Improved recovery in glutathione peroxidase transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 4351-4356, 2000.

GAETA, A. e HIDER, R. C. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *British Journal of Pharmacology*. **146**: 1041-1059, 2005.

GAETANI, G. F., FERRARIS, A. M., ROLFO, M., MANGERINI, R., ARENA, S. e KIRKMAN, H. N. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*. **87**: 1595-1599, 1996.

GAY, C. A. e GERBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem.* **304**: 42-46, 2002.

GOSSLAU, A. e RENSING, L. Induction of Hsp68 by oxidative stress involves the lipooxygenase pathway in C6 rat glioma cells. *Brain Research*. **864**: 114-123, 2000.

GREEN, A. K., STRATTON, R. C., SQUIRES, P. E. e SIMPSON, A. W. M. Atrial Natriuretic Peptide Attenuates Elevations in Ca^{2+} and Protects Hepatocytes by Stimulating Net Plasma Membrane Ca^{2+} Efflux. *Journal of Biological Chemistry*. **282**: 34542-34554, 2007.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. **8**: 89-193, 1985.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*. **59**: 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J. e ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. **33**: 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford. 2007. 936 p.

HELMA, C. e UHL, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat Res.* **466**: 9-15, 2000.

HERMANN, C., ZEIHNER, A. M. e DIMMELER, S. Shear Stress Inhibits H_2O_2 -Induced Apoptosis of Human Endothelial Cells by Modulation of the Glutathione Redox Cycle and Nitric Oxide Synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **17**: 3588-3592, 1997.

HIGUCHI, Y., TANII, H., KORIYAMA, Y., MIZUKAMI, Y. e YOSHIMOTO, T. Arachidonic acid promotes glutamate-induced cell death associated with necrosis by 12-lipoxygenase activation in glioma cells. *Life Sciences*. **80**: 1856-1864, 2007.

HIRRLINGER, J., RESCH, A., GUTTERER, J. M. e DRINGEN, R. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *Journal of Neurochemistry*. **82**: 635-644, 2002.

- HOLLEY, A. K., DHAR, S. K., XU, Y. e CLAIR, D. K. S. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids*: 2010.
- HO, Y.-S., XIONG, Y., MA, W., SPECTO, A. e HO, D. S. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. **Vol. 279**: 32804-32812, 2004.
- HOMI, H. M., FREITAS, J. J. S., CURI, R., VELASCO, I. T. e JUNIOR, B. A. S. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. *Neuroscience Letters*. **333**: 37-40, 2002.
- IMMENSCHUH, S. e BAUMGART-VOGT, E. Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation. . *Antioxidants & Redox Signaling*. **7**: 768-777, 2005.
- JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. **666-667**: 387-392, 2003.
- JOLITHA, A. B., SUBRAMANYAM, M. V. V. e ASHA DEVI, S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Experimental Gerontology*. **41**: 753-763, 2006.
- JOHNSON, F. e GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine* **26**: 340-352, 2005.
- JÖNSSON, T. J. e LOWTHER, W. T. The Peroxiredoxin Repair Proteins. *Subcell Biochem.* . **44**: 115-141, 2007.
- KEMMERLING, U., MUÑOZ, P., MÜLLER, M., SÁNCHEZ, G., AYLWIN, M. L., KLANN, E., CARRASCO, M. A. e HIDALGO, C. Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium*. **41**: 491-502, 2007.
- KIM, S.-U., JIN, M.-H., KIM, Y. S., LEE, S.-H., CHO, Y. S., CHO, K.-J., LEE, K.-S., KIM, Y. I., KIM, G. W., KIM, J.-M., LEE, T.-H., LEE, Y.-H., SHONG, M., KIM, H.-C., CHANG, K.-T., YU, D.-Y. e LEE, D.-S. Peroxiredoxin II preserves cognitive function against age-linked hippocampal oxidative damage. *Neurobiology of Aging*. 2009.
- KLEBE, R. J. e RUDDLE, F. H. Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J. Cell Biol.* **43**: 69A, 1969.
- KOWALTOWSKI, A. J., DE SOUZA-PINTO, N. C., CASTILHO, R. F. e VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. **47**: 333-343, 2009.
- LEAL, R. B., GONÇALVES, C. A. e RODNIGHT, R. Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. *Developmental Brain Research*. **104**: 1-10, 1997.
- LEEMAN, W. R., VAN DE GEVEL, I. A. e RUTTEN, A. A. J. J. L. Cytotoxicity of retinoic acid, menadione and aflatoxin B1 in rat liver slices using Netwell inserts as a new culture system. *Toxicology in Vitro*. **9**: 291-295, 1995.

LI, Q., HARRAZ, M. M., ZHOU, W., ZHANG, L. N., DING, W., ZHANG, Y., EGGLESTON, T., YEAMAN, C., BANFI, B. e ENGELHARDT, J. F. Nox2 and Rac1 Regulate H₂O₂-Dependent Recruitment of TRAF6 to Endosomal Interleukin-1 Receptor Complexes. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 140-154, 2006.

LIANG, H.-W., XIA, Q. e BRUCE, I. C. Reactive oxygen species mediate the neuroprotection conferred by a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener during ischemia in the rat hippocampal slice. *Brain Research.* **1042**: 169-175, 2005.

LINDEN, A., GÜLDEN, M., MARTIN, H.-J., MASER, E. e SEIBERT, H. Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicology in Vitro.* **22**: 1371-1376, 2008.

LIU, R., LIU, I. Y., BI, X., THOMPSON, R. F., DOCTROW, S. R., Malfroy, B. e BAUDRY, M. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **100**: 8526-8531, 2003.

LOVELL, M. A., XIE, C., GABBITA, S. P. e MARKESBERY, W. R. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in alzheimer's disease brain. *Free Radical Biology and Medicine.* **28**: 418-427, 2000.

LOW, F. M., HAMPTON, M. B., PESKIN, A. V. e WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood.* **109**: 2611-2617, 2007.

LUNG, H.-L., SHAN, S.-W., TSANG, D. e LEUNG, K.-N. Tumor necrosis factor-[alpha] mediates the proliferation of rat C6 glioma cells via [beta]-adrenergic receptors. *Journal of Neuroimmunology.* **166**: 102-112, 2005.

MAIER, C. M. e CHAN, P. H. Role of Superoxide Dismutases in Oxidative Damage and Neurodegenerative Disorders. *Neuroscientist.* **8**: 323-334, 2002.

MAKINO, N., MISE, T. e SAGARA, J.-I. Kinetics of hydrogen peroxide elimination by astrocytes and C6 glioma cells: Analysis based on a mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* **1780**: 927-936, 2008.

MARTINDALE, J. L. e HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology.* **192**: 1-15, 2002.

MAULIK, N. e DAS, D. K. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* **1780**: 1368-1382, 2008.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of Biological Chemistry.* **269**: 9397-9400, 1994.

MENG, Z. e NIE, A. Effects of hydrogen peroxide on sodium current in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons. *Toxicology Letters.* **147**: 45-52, 2004.

MILLER, C. C. J., ACKERLEY, S., BROWNLEES, J., GRIERSON, A. J., JACOBSEN, N. J. O. e THORNHILL, P. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **59**: 323-330, 2002.

- MISHRA, M. K., GHOSH, D., DUSEJA, R. e BASU, A. Antioxidant potential of Minocycline in Japanese Encephalitis Virus infection in murine neuroblastoma cells: Correlation with membrane fluidity and cell death. *Neurochemistry International*. **54**: 464-470, 2009.
- MITSUMOTO, A., TAKANEZAWA, Y., OKAWA, K., IWAMATSU, A. e NAKAGAWA, Y. Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. *Free Radical Biology and Medicine*. **30**: 625-635, 2001.
- MIZUSAWA, H., ISHII, T. e BANNAI, S. Peroxiredoxin I (macrophage 23 kDa stress protein) is highly and widely expressed in the rat nervous system. *Neuroscience Letters*. **283**: 57-60, 2000.
- MOLZ, S., THARINE, D.-C., DECKER, H. e TASCA, C. I. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain Research*. **1231**: 113-120, 2008.
- MONTEIRO, H. P. e STERN, A. Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radical Biology and Medicine*. **21**: 323-333, 1996.
- MORATO, E. e MAYOR JR, F. Production of the Alzheimer's [beta]-amyloid peptide by C6 glioma cells. *FEBS Letters*. **336**: 275-278, 1993.
- MUELLER, S., RIEDEL, H.-D. e STREMMEL, W. Direct Evidence for Catalase as the Predominant H₂O₂ -removing Enzyme in Human Erythrocytes. *Blood*. **90**: 4973-4978, 1997.
- MUGESH, G. e MONT, W. W. D. Structure-Activity Correlation between Natural Glutathione Peroxidase (GPx) and Mimics: A Biomimetic Concept for the Design and Synthesis of More Efficient GPx Mimics. *Chemistry*. **7**: 1365-1370, 2001.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**: 1-13, 2009.
- NADIN, S. B., VARGAS-ROIG, L. M. e CIOCCA, D. R. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *J. Histochem. Cytochem.* **49**: 1183-1186, 2001.
- NESTLER, E. J., BARROT, M., DILEONE, R. J., EISCH, A. J., GOLD, S. J. e MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of Depression. *Neuron*. **34**: 13-25, 2002.
- NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. **47**: 469-484, 2009.
- NORDBERG, J. e ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. **31**: 1287-1312, 2001.
- NOZAKI, K., NISHIMURA, M. e HASHIMOTO, N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Molecular Neurobiology*. **23**: 1-19, 2001.
- OGUSUCU, R., RETTORI, D., MUNHOZ, D. C., SOARES NETTO, L. E. e AUGUSTO, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*. **42**: 326-334, 2007.

- OLMSTED, B., CARLSON, K., KLEBE, R., RUDDLE, F. e ROSENBAUM, J. Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Proc Natl Acad Sci.* **65**: 129-136, 1970.
- ONARAN, I., GUVEN, G. S., OZDAS, S. B., KANIGUR, G. e VEHID, S. Metformin does not prevent DNA damage in lymphocytes despite its antioxidant properties against cumene hydroperoxide-induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* **611**: 1-8, 2006.
- OSUCHOWSKI, M. F. e SHARMA, R. P. Fumonisin B1 Induces Necrotic Cell Death in BV-2 Cells and Murine Cultured Astrocytes and is Antiproliferative in BV-2 Cells While N2A Cells and Primary Cortical Neurons are Resistant. *NeuroToxicology.* **26**: 981-992, 2005.
- PARSONAGE, D., YOUNGBLOOD, D. S., SARMA, G. N., WOOD, Z. A., KARPLUS, P. A. e POOLE, L. B. Analysis of the Link between Enzymatic Activity and Oligomeric State in AhpC, a Bacterial Peroxiredoxin. *Biochemistry.* **44**: 10583-10592, 2005.
- PESKIN, A. V., LOW, F. M., PATON, L. N., MAGHZAL, G. J., HAMPTON, M. B. e WINTERBOURN, C. C. The High Reactivity of Peroxiredoxin 2 with H₂O₂ Is Not Reflected in Its Reaction with Other Oxidants and Thiol Reagents. *Journal of Biological Chemistry.* **282**: 11885-11892, 2007.
- PETÁK, I., MIHALIK, R., BAUER, P. I., SÜLI-VARGHA, H., SEBESTYÉN, A. e KOPPER, L. BCNU is a caspase-mediated inhibitor of drug-induced apoptosis. *Cancer Research.* **58**: 614-618, 1998.
- POSSER, T., FRANCO, J. L., DOS SANTOS, D. A., RIGON, A. P., FARINA, M., DAFRÉ, A. L., TEIXEIRA ROCHA, J. B. e LEAL, R. B. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Research.* **1199**: 138-147, 2008.
- POWER, J. H. T., ASAD, S., CHATAWAY, T. K., CHEGINI, F., MANAVIS, J., TEMLETT, J. A., JENSEN, P. H., BLUMBERGS, P. C. e GAI, W.-P. Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol.* **115**: 611-622, 2008.
- PUTNAM, C. D., ARVAI, A. S., BOURNE, Y. e TAINER, J. A. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology.* **296**: 295-309, 2000.
- QUINCOZES-SANTOS, A., ANDREAZZA, A. C., NARDIN, P., FUNCHAL, C., GONÇALVES, C.-A. e GOTTFRIED, C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *NeuroToxicology.* **28**: 886-891, 2007.
- RAHA, S. e ROBINSON, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences.* **25**: 502-508, 2000.
- RAY, S. K., WILFORD, G. G., CROSBY, C. V., HOGAN, E. L. e BANIK, N. L. Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells. *Brain Research.* **829**: 18-27, 1999.
- REKLING, J. C. Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. *Neuroscience Letters.* **335**: 167-170, 2003.

- RHEE, S. G., CHANG, T.-S., BAE, Y. S., LEE, S.-R. e KANG, S. W. Cellular Regulation by Hydrogen Peroxide. *J Am Soc Nephrol.* **14**: S211-215, 2003.
- RHEE, S. G., CHAE, H. Z. e KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine.* **38**: 1543-1552, 2005.
- ROHN, T. T. e MOUSER, P. Caspase cleavage of GFAP within degenerating astrocytes may lead to a compromised blood-brain-barrier in the Alzheimer's disease brain. *Alzheimer's and Dementia.* **1**: S66-S66, 2005.
- ROSA, R. M., HOCH, N. C., FURTADO, G. V., SAFFI, J. e HENRIQUES, J. A. P. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* **633**: 35-45, 2007.
- RÜWELER, M., GÜLDEN, M., MASER, E., MURIAS, M. e SEIBERT, H. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astrogloma cells in vitro. *Chemico-Biological Interactions.* **182**: 128-135, 2009.
- SANO, N., KURATA, O., OKAMOTO, N. e IKEDA, Y. A new fluorochromasia method using a fluorescence microplate reader for assay of cytotoxic activity of carp leucocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* **47**: 173-178, 1995.
- SARAFIAN, T. A., VERITY, M. A., VINTERS, H. V., SHIH, C. C. Y., SHI, L., JI, X. D., DONG, L. e SHAU, H. Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *Journal of Neuroscience Research.* **56**: 206-212, 1999.
- SCHAFER, F. Q. e BUETTNER, G. G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine.* **30**: 1191-1212, 2001.
- SCHENK, P. W. e SNAAR-JAGALSKA, B. E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* **1449**: 1-24, 1999.
- SCHREIBELT, G., VAN HORSSSEN, J., HASELOFF, R. F., REIJERKERK, A., VAN DER POL, S. M. A., NIEUWENHUIZEN, O., KRAUSE, E., BLASIG, I. E., DIJKSTRA, C. D., RONKEN, E. e DE VRIES, H. E. Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine.* **45**: 256-264, 2008.
- SCORZA, F. A., GUERRA, A. D. B. G., CAVALHEIRO, E. A. e CALIL, H. M. Neurogênese e depressão: etiologia ou nova ilusão? *Rev Bras Psiquiatr.* **27**: 249-253, 2005.
- SEYFRIED, J. e WÜLLNER, U. Inhibition of Thioredoxin reductase induces apoptosis in neuronal cell lines: Role of glutathione and the MKK4/JNK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **359**: 759-764, 2007.
- SHIRPOOR, A., MINASSIAN, S., SALAMI, S., KHADEM-ANSARI, M. H., GHADERI-PAKDEL, F. e YEGHIAZARYAN, M. Vitamin E protects developing rat hippocampus and cerebellum against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis. *Food Chemistry.* **113**: 115-120, 2009.

SHUVAEVA, T. M., NOVOSELOV, V. I., FESENKO, E. E. e LIPKIN, V. M. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. **35**: 523-537, 2009.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. **82**: 291-295, 1997.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. e SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. **175**: 184-191, 1988.

SMITH, P. S., ZHAO, W., SPITZ, D. R. e ROBBINS, M. E. Inhibiting catalase activity sensitizes 36B10 rat glioma cells to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. **42**: 787-797, 2007.

SMITH-PEARSON, P. S., KOOSHKI, M., SPITZ, D. R., POOLE, L. B., ZHAO, W. e ROBBINS, M. E. Decreasing peroxiredoxin II expression decreases glutathione, alters cell cycle distribution, and sensitizes glioma cells to ionizing radiation and H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine*. **45**: 1178-1189, 2008.

SOKOLOVA, T., GUTTERER, J. M., HIRRLINGER, J., HAMPRECHT, B. e DRINGEN, R. Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neuroscience Letters*. **297**: 129-132, 2001.

SOYER, O. S., SALATHÉ, M. e BONHOEFFER, S. Signal transduction networks: Topology, response and biochemical processes. *Journal of Theoretical Biology*. **238**: 416-425, 2006.

SPASOJEVIC, I., BAJIC, A., JOVANOVIĆ, K., SPASIC, M. e ANDJUS, P. Protective role of fructose in the metabolism of astroglial C6 cells exposed to hydrogen peroxide. *Carbohydrate Research*. **344**: 1676-1681, 2009.

TALPOS, J. C., DIAS, R., BUSSEY, T. J. e SAKSIDA, L. M. Hippocampal lesions in rats impair learning and memory for locations on a touch-sensitive computer screen: The "ASAT" task. *Behavioural Brain Research*. **192**: 216-225, 2008.

TANDOGAN, B. e ULUSU, N. N. Kinetic Mechanism and Molecular Properties of Glutathione Reductase. *J. Pharm. Sci.* **31**: 230-237, 2006.

TANG, H., HAO, Q., RUTHERFORD, S. A., LOW, B. e ZHAO, Z. J. Inactivation of Src Family Tyrosine Kinases by Reactive Oxygen Species in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. **280**: 23918-23925, 2005.

TEYLER, T. J. Use of Brain Slices to Study Long-Term Potentiation and Depression as Examples of Synaptic Plasticity. *Methods*. **18**: 109-116, 1999.

TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. e TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **57**: 145-155, 2003.

TRETTET, L., RÉPÁSSY, R. e ADAM-VIZI, V. Endogenous glutamate contributes to the maintenance of glutathione level under oxidative stress in isolated nerve terminals. *Neurochemistry International*. **42**: 393-400, 2003.

ULUSU, N., ACAN, N., TURAN, B. e TEZCAN, E. Inhibition of glutathione reductase by cadmium ion in some rabbit tissues and the protective role of dietary selenium. *Biological Trace Element Research*. **91**: 151-156, 2003.

VALENCIA, A. e MORÁN, J. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radical Biology and Medicine*. **36**: 1112-1125, 2004.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. e TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **39**: 44-84, 2007.

VEAL, E. A., DAY, A. M. e MORGAN, B. A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*. **26**: 1-14, 2007.

VÖLKEL, W., SICILIA, T., PÄHLER, A., GSELL, W., TATSCHNER, T., JELLINGER, K., LEBLHUBER, F., RIEDERER, P., LUTZ, W. K. e GÖTZ, M. E. Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. **48**: 679-686, 2006.

WALTHER, U. I., CZERMAK, A., MUCKTER, H., WALTHER, S. C. e FICHTL, B. Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines. *Arch Toxicol* **77**: 131-137, 2003.

WARD, R. J., KEST, W., BRUYEER, P., LALLEMAND, F. e P.WITTE. Taurine modulates catalase, aldehyde dehydrogenase and ethanol elimination in rat brain. *Alcohol & Alcoholism*. **36**: 39-43, 2001.

WHITE, A. R., BUSH, A. I., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L. e CAPPAL, R. Exacerbation of copper tyotoxicity in primary neuronal cultures depleted of cellular glutathione. *J. Neurochem.* . **72**: 2092-2098, 1999.

WHITE, B. C., SULLIVAN, J. M., DEGRACIA, D. J., O'NEIL, B. J., NEUMAR, R. W., GROSSMAN, L. I., RAFOLS, J. A. e KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*. **179**: 1-33, 2000.

WILLIAMS, C. H., ARSCOTT¹, L. D., MÜLLER, S., LENNON, B. W., LUDWIG, M. L., WANG, P. F., VEINE, D. M., BECKER, K. e SCHIRMER, R. H. Thioredoxin reductase: Two modes of catalysis have evolved. . *Eur. J. Biochem.* . **267**: 6110-6117, 2000.

WINTERBOURN, C. C. e HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. **45**: 549-561, 2008.

WINYARD, P. G., MOODY, C. J. e JACOB, C. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in Biochemical Sciences*. **30**: 453-461, 2005.

WOLTJER, R. L., NGHIEM, W., MAEZAWA, I., MILATOVIC, D., VAISAR, T., MONTINE, K. S. e MONTINE, T. J. Role of glutathione in intracellular amyloid- α precursor protein/carboxy-terminal fragment aggregation and associated cytotoxicity. *Journal of Neurochemistry*. **93**: 1047-1056, 2005.

WOO, H. A., CHAE, H. Z., HWANG, S. C., YANG, K.-S., KANG, S. W., KIM, K. e RHEE, S. G. Reversing the Inactivation of Peroxiredoxins Caused by Cysteine Sulfinic Acid Formation. *Science*. **300**: 653-656, 2003.

WOO, H. A., WON KANG, S., KIM, H. K., YANG, K.-S., CHAE, H. Z. e RHEE, S. G. Reversible Oxidation of the Active Site Cysteine of Peroxiredoxins to Cysteine Sulfinic Acid. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 47361-47364, 2003.

WOOD, Z. A., SCHRÖDER, E., ROBIN HARRIS, J. e POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*. **28**: 32-40, 2003.

XIAO, J. e WANG, S.-R. A new slicing method for the lower vertebrate brain: Brain mould and adjustable stage. *Journal of Neuroscience Methods*. **80**: 13-17, 1998.

YAN, C.-H., YUAN, X.-B., KANG, C., ZHAO, Y.-H., LIU, J., GUO, Y., LU, J., PU, P. e SHENG, J. Preparation of Carmustine-loaded PLA ultrasmall-nanoparticles by adjusting micellar behavior of surfactants. *Journal of Applied Polymer Science*. **110**: 2446-2452, 2008.

YANG, K.-S., KANG, S. W., WOO, H. A., HWANG, S. C., CHAE, H. Z., KIM, K. e RHEE, S. G. Inactivation of Human Peroxiredoxin I during Catalysis as the Result of the Oxidation of the Catalytic Site Cysteine to Cysteine-sulfinic Acid. *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 38029-38036, 2002.

YANG, D.-I., YIN, J.-H., JU, T.-C., CHEN, L.-S. e HSU, C. Y. Nitric oxide and BCNU chemoresistance in C6 glioma cells: Role of S-nitrosoglutathione. *Free Radical Biology and Medicine*. **36**: 1317-1328, 2004.

YAO, K., FALICK, A. M., PATEL, N. e CORREIA, M. A. Cumene hydroperoxide-mediated inactivation of cytochrome P450 2B1. Identification of an active site heme-modified peptide. *Journal of Biological Chemistry*. **268**: 59-65, 1993.

ZHANG, Z. Y., ZHOU, B. e XIE, L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*. **93**: 307-317, 2002.

ZHAO, Y., SEEFELDT, T., CHEN, W., WANG, X., MATTHEES, D., HU, Y. e GUAN, X. Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **485**: 56-62, 2009.

ZHOU, J., WANG, H., FENG, Y. e CHEN, J. Increased expression of cdk5/p25 in N2a cells leads to hyperphosphorylation and impaired axonal transport of neurofilament proteins. *Life Sciences*. **86**: 532-537, 2010.

ZHU, Q.-C., SHEN, B.-X., LING, H. e GU, R. Cumene hydroperoxide hydrogenation over Pd/C catalysts. *Journal of Hazardous Materials*. **175**: 646-650, 2010.

ZIELINSKA, M., GÜLDEN, M. e SEIBERT, H. Effects of quercetin and quercetin-3-O-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **13**: 47-53, 2003.